



BP

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

①② Patentschrift  
①⑩ DE 44 47 287 C 1

⑥① Int. Cl. 6:  
A 61 K 9/127  
A 61 K 45/08

②① Aktenzeichen: P 44 47 287.0-41  
②② Anmeldetag: 30. 12. 94  
④③ Offenlegungstag: —  
④⑤ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 7. 11. 96

DE 44 47 287 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:  
Cevc, Gregor, Prof. Dr., 85551 Kirchheim, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
W. Maiwald und Kollegen, 80336 München

⑦② Erfinder:  
gleich Patentinhaber

⑥⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

EP	2 24 837
WO	93 19 737
WO	93 19 736
WO	92 05 771
WO	90 09 782
WO	9 10 413

⑥④ Präparat zum Wirkstofftransport durch Barrieren

⑥⑦ Präparat zur Wirkstoffapplikation in Form kleinster Tröpfchen, insbesondere mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Moleküle bzw. mit einer amphiphilen Trägersubstanz versehenen Flüssigkeitströpfchen, insbesondere zum Transport des Wirkstoffes in und durch natürliche Barrieren und Konstrictionen wie Häute und dergleichen. Das Präparat weist keinen Solubilisierungspunkt auf oder die Präparatzusammensetzung ist bei maximaler Permeationsfähigkeit weit vom Solubilisierungspunkt entfernt. Das Präparat weist einen Gehalt von mindestens zwei Komponenten auf, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium der Präparate, üblicherweise Wasser, um mindestens den Faktor 10 unterscheiden.

DE 44 47 287 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Präparate zur Applikation von Wirkstoffen in Form kleinster in einem flüssigen Medium suspendierbarer Flüssigkeitströpfchen mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Moleküllagen, die einen Wirkstoff umfassen und insbesondere zum Transport des Wirkstoffes durch Barrieren, beispielsweise natürliche Permeabilitätsbarrieren und Konstruktionen in Häuten, Schleimhäuten, Organen und dergleichen, geeignet sind.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung solcher Präparate, insbesondere zur nichtinvasiven Verabreichung von Wirkstoffen.

Die Applikation von Wirkstoffen wird häufig durch natürliche Barrieren wie Häute eingeschränkt, die ein ausreichendes Einbringen von Wirkstoffen verhindern, da sie für Wirkstoffe zu wenig durchlässig sind. Aufgrund der Permeationsbarriere der Haut müssen z. B. die meisten gängigen Therapeutika entweder peroral oder parenteral (i.v., i.m., i.p.) verabreicht werden. Intrapulmonale und intranasale Anwendungen von Aerosolen, der Einsatz von Rektalzapfchen, die Applikation von Schleimhautgelen, ocularen Präparaten usw. lassen sich nur an bestimmten Stellen und nicht mit allen Wirkstoffen realisieren. Das Einbringen von Wirkstoffen in das pflanzliche Gewebe unterliegt aufgrund der kutikulären Wachsschichten noch stärkeren Beschränkungen.

Nichtinvasive Applikationen von Wirkstoffpräparaten, die geeignet sind, solche Permeabilitätsbarrieren zu durchdringen, wären in vielen Fällen vorteilhaft. Bei Mensch und Tier würde beispielsweise eine perkutane Applikation solcher Präparate die verabreichten Wirkstoffe vor der Zersetzung im Gastrointestinaltrakt schützen und gegebenenfalls eine modifizierte Agensverteilung im Körper zur Folge haben; sie kann die Pharmakokinetik der Droge beeinflussen und sowohl häufige, als auch einfache, nichtinvasive Behandlung erlauben (Karzel K., Liedtke, R.K. (1989) *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 39, 1487—1491). Bei Pflanzen könnte eine verbesserte Penetration durch oder in die Kutikula die für eine gewünschte Wirkung erforderliche Wirkstoffkonzentration senken und zusätzlich die Umweltbelastung signifikant herabsetzen (Price, C.E. (1981) In: *The plant cuticle* (D.F. Cutler, K.L. Alvin, C.E. Price, Hrsgb.), Academic, New York, pp 237—252).

Bestrebungen, die Hautdurchlässigkeit durch geeignete Maßnahmen zu beeinflussen, sind vielfach besprochen worden (siehe z. B. Karzel und Liedtke, op. cit.). Besonders erwähnenswert sind z. B. Jetinjektion (Siddiqui & Chien (1987) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 3, 195—208.), der Einsatz von elektrischen Feldern (Burnette & Ongpipattanakul (1987) *J. Pharm. Sci.* 76, 765—773) oder die Verwendung von chemischen Additiven, wie z. B. von Lösungsmitteln oder Tensiden. Eine lange Liste von Hilfsstoffen, die zwecks Erhöhung der Penetration eines wasserlöslichen Wirkstoffes (Nolaxon) in die Haut getestet wurden, ist z. B. in der Arbeit von Aungst et. al. (1986, *Int. J. Pharm.* 33, 225—234) enthalten.

Das bekannteste Verfahren zur Erhöhung der Wirkstoffpenetration durch die Haut oder Schleimhaut beruht auf der Verwendung von Penetrationsverstärkern. Solche Penetrationsverstärker umfassen nichtionische Stoffe (langkettige Alkohole, Tenside, zwitterionische Phospholipide), anionische Stoffe (besonders Fettsäuren), kationische langkettige Amine, Sulfoxide sowie diverse Aminoderivate; sowie amphothere Glycinate und Betaine. Trotz allem ist jedoch das Problem der Wirkstoffpenetration in die Haut bisher nicht — oder nicht befriedigend — gelöst worden.

Eine Übersicht der Maßnahmen, die zwecks Erhöhung der Wirkstoffpenetration durch die pflanzliche Kutikula eingesetzt werden, ist in der Arbeit von Price (1981, op. cit.) zusammengefaßt.

Die bisher ausschließlich occlusiv verwendeten Penetrationsverstärker erhöhen die Penetrationsfähigkeit an der Permeabilitätsbarriere der Haut- oder Schleimhautoberfläche, indem sie die Fluidität eines Teils der Lipide in dieser Barriere erhöhen. Wenn chemische Penetrationsverstärker verwendet wurden, ist es bisher üblich gewesen, diese dem wirkstoffhaltigen Gemisch einfach hinzuzufügen; lediglich im Falle von menschlicher Haut wurden Additiva manchmal auch vorab, in Form einer organischen Lösung, aufgetragen. Diese Darbringungsform hing mit den bisher untersuchten und diskutierten Wirkungsprinzipien von Additiven zusammen: Im allgemeinen ging man davon aus, daß die verstärkte Agenspenetration einerseits auf der Aufweichung (Fluidisierung) der Haut basiert (Golden et. al., (1987) *J. Pharm. Sci.* 76, 25—28). Diese Hautaufweichung geht in der Regel mit einer Zerstörung der Hautoberfläche und ihren schützenden Barriereigenschaften einher und ist folglich unerwünscht. Andererseits wurde gezeigt, daß manche Wirkstoffe durch die Haut in Form von niedrigmolekularen Komplexen mit den Zusatzmolekülen permeieren (Green et. al., (1988) *Int. J. Pharm.* 48, 103—111).

Von diesen Konzepten abweichende Vorschläge, wie die epidermale Anwendung von Lipidsuspensionen, brachten bisher wenig Verbesserung. Solche Suspensionen enthalten typischerweise Vesikel oder O/W- bzw. W/O-Emulgatoren.

Der von mehreren Autoren theoretisch diskutierte perkutane Einsatz von Trägern auf Lipidbasis, den Liposomen (Patel, Bioch. Soc. Trans., 609th Meeting, 13, 513—517, 1985, Mezei, M. *Top. Pharm. Sci.* (Proc. 45th Int. Congr. Pharm. Sci. F.I.P.) 345—58 Elsevier, Amsterdam, 1985) zielte hauptsächlich auf die Beeinflussung der Wirkstoffkinetik. Es war vom Einsatz herkömmlicher Lipidvesikel die Rede, die die Haut nicht oder extrem unvollkommen passieren, wie in dieser Anmeldung gezeigt ist. Der Einsatz von Liposomen, Niosomen oder anderen üblichen Lipidvesikeln ist daher auf äußere Hautschichten beschränkt.

Die japanische Patentanmeldung JP 61/271204 A2 [86/271204] griff die Verwendung von Liposomen durch Verwendung von Hydrochinon-Glucosidal als wirkstoffstabilitätserhöhenden Stoff im ähnlichen Sinne auf.

Als Verbesserung wurde in der WO 87/1938 A1 vorgeschlagen, die wirkstoffbeladenen Lipidvesikel zusammen mit einem Gelbildner in Form von "transdermal patches" zu verwenden. Die Wirkzeit konnte auf diese Weise verlängert, die Penetrationsfähigkeit des Wirkstoffes jedoch kaum erhöht werden. Durch massiven Einsatz von penetrationsförderndem Polyethylenglycol und Fettsäuren zusammen mit Lipidvesikeln gelang es Gesztes und Mezei (1988, *Anesth. Analg.* 67, 1079—1081) eine lokale Analgesie mit lidocainhaltigen Trägern zu erreichen, allerdings erst nach mehreren Stunden occlusiver Applikation und in geringem Maßstab.

Weiterhin wurden Trägerformulierungen aufgefunden, die für eine Penetration in und durch Permeabilitätsbarrieren geeignet sind. So konnten die Ergebnisse von Gesztes und Mezei durch eine Spezialformulierung, die filtrierte, detergentshaltige Lipidvesikel (Liposomen) mit einem deklarierten optimalen Lipid/Tensid Gehalt von 1—40/1, in der Praxis zumeist um 4/1 aufweisen, erstmalig dramatisch übertroffen werden.

Weiterhin wurde erkannt, daß alle solchen Träger für eine Penetration in und durch die Permeabilitätsbarrieren geeignet sind, die genügend elastisch sind, um durch die Konstruktionen der Barriere, z. B. der Haut, dringen zu können. Dies insbesondere dann, wenn die Träger nach der Applikation selbst einen Gradienten an der Permeabilitätsbarriere aufbauen, da sie in diesem Fall zur spontanen Penetration der Permeabilitätsbarriere tendieren. In den Patentanmeldungen DE-41 07 152 und DE-41 07 153 sind erstmalig Träger, im folgenden als Transfersomen bezeichnet, beschrieben, die zum Wirkstofftransport durch nahezu beliebige Permeationshindernisse tauglich sind.

Transfersomen unterscheiden sich von den bisher für die topische Anwendung beschriebenen Liposomen und von sonstigen verwandten Trägern in mehreren Grundeigenschaften. Transfersomen sind in der Regel viel größer als herkömmliche mizellenartige Trägerformulierungen und unterliegen daher anderen Diffusionsgesetzen. So ist die Permeabilität keine lineare Funktion des Antriebsdruckes, wie bei Liposomen, d. h. bei Transfersomen nimmt die Permeabilität im Gegensatz zu Liposomen oder anderen bekannten ähnlichen Trägersystemen bei steigendem Druck überproportional bzw. nicht linear zu. Ferner können mittels Transfersomen durch Konstruktionen eingebrachte Substanzen im Menschen fast 100% des maximal erreichbaren biologischen oder therapeutischen Potentials entfalten. So erreichen beispielsweise regelmäßig mehr als 50%, häufig mehr als 90%, der perkutan applizierten transfersomal verpackten Wirkstoffe ihren Bestimmungsort im Körper. Diese in der EP 475 160 und WO 92/03122 beschriebenen Transfersomen weisen einen Gehalt einer randaktiven Substanz auf, der bis zu 99 Mol-% des Gehaltes und wenigstens 0,1 Mol-% dieser Substanz entspricht, durch den der Solubilisierungspunkt der Tröpfchen erreicht wird.

Als entscheidende Bedingung für die gesteigerte Penetrationsfähigkeit der Transfersomen gegenüber Liposomen oder anderen ähnlichen bekannten Trägern wurde dabei der Gehalt an randaktiver Substanz angegeben, der eine optimierte Annäherung an die Solubilisierungsgrenze der Transfersomen bewirkt, (d. h. an einen Gehalt an randaktiver Substanz, der die Transfersomen vollkommen destabilisiert), damit sie genügend elastisch sind, um die Konstruktionen in der Barriere, z. B. in der Haut, durchdringen zu können.

Es wäre nun höchst wünschenswert, bei der Formulierung solch hochgradig permeationsfähiger Präparate nicht an die genannten Gehaltsbereiche gebunden zu sein.

Es ist daher eine Aufgabe der Erfindung, Transfersomen, die entweder keinen Solubilisierungspunkt haben oder weit entfernt vom Solubilisierungspunkt sind, für die Applikation von Wirkstoffen anzugeben, die deren schnellen und wirksamen Transport durch Barrieren und Konstruktionen gestattet.

Aufgabe der Erfindung ist es weiterhin, Transfersomen zum Wirkstofftransport durch menschliche, tierische und pflanzliche Barrieren zur Verfügung zu stellen, die eine verbesserte Verfügbarkeit des Wirkstoffes am Wirkungsort ermöglichen.

Aufgabe der Erfindung ist es weiterhin, ein Verfahren zur Herstellung solcher Transfersomen zum Wirkstofftransport anzugeben.

Zur Lösung dieser Aufgabe dienen die Merkmale der unabhängigen Ansprüche.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß auch Transfersomenpräparate gebildet werden können, die zur Applikation bzw. zum Transport von wenigstens einem Wirkstoff, insbesondere für medizinische und biologische Zwecke, in und durch natürliche Barrieren und Konstruktionen wie Häute und dergleichen geeignet sind und die Form von in einem flüssigen Medium suspendierbaren Flüssigkeitströpfchen haben, die mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Trägersubstanz versehen sind, wobei die Trägersubstanz wenigstens zwei (physiko)chemisch verschiedene amphiphile Komponenten umfaßt, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium der Transfersomen (üblicherweise Wasser), um einen Faktor von mindestens 10 unterscheiden, wenn deren Gehalt an solubilisierenden Komponenten weniger als 0,1 Mol-% bezogen auf den Gehalt an diesen Substanzen beträgt, bei dem der Solubilisierungspunkt der umhüllten Tröpfchen erreicht wird oder die amphiphilen Komponenten so ausgewählt sind, daß konzentrationsunabhängig überhaupt keine Solubilisierung der umhüllten Tröpfchen erfolgt.

Die erfindungsgemäßen Präparate, im folgenden wiederum als Transfersomen bezeichnet, können aus beliebigen amphiphilen Komponenten hergestellt werden, die ausreichend unterschiedliche Löslichkeiten aufweisen. Diese Bedingung wird erfüllt, wenn die Löslichkeiten der einzelnen Trägerkomponenten des Transfersoms im Suspensionsmedium sich um mindestens den Faktor  $10^4$  (und bis zu  $10^7$ ) unterscheiden. Die Erfüllung dieser Bedingung sorgt dafür, daß die membranartige Hülle der resultierenden Transfersomen unter dem Einfluß eines Gradienten, beispielsweise an einer intakten natürlichen Barriere wie der Haut, eine gesteigerte Deformierbarkeit besitzt. Diese Eigenschaft befähigt die erfindungsgemäßen Transfersomen zur Penetration durch die Konstruktionen in beliebigen Permeabilitätsbarrieren.

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Präparate, durch Konstruktionen zu permeieren, beträgt mindestens 0,01 Promille, vorzugsweise jedoch mehr als 1 Promille der Permeabilität von kleinen, im wesentlichen ungehindert permeierten Molekülen.

Der Begriff Löslichkeit, wie hier verwendet, bezieht sich nach gegenwärtiger Kenntnis (aber ohne an eine theoretisch-wissenschaftliche Definition gebunden sein zu müssen) auf sogenannte echte Lösungen. Jedenfalls wird bei Erreichen einer jeweiligen Grenzkonzentration eine Löslichkeitsgrenze beobachtet, die durch die Bildung eines Niederschlags, die Bildung von Kristallen, die Bildung von Suspensionen oder durch die Bildung von molekularen Aggregaten wie beispielsweise Micellen definiert ist. Für selbstaggregierende Moleküle entspricht die Löslichkeitsgrenze typischerweise der kritischen Selbstaggregationskonzentration (CAC). Für micel-

len-bildende Moleküle entspricht die Löslichkeitsgrenze typischerweise der kritischen Micellenbildungskonzentration (CMC).

Die erfindungsgemäßen Transfersomen unterscheiden sich erheblich von den bisher beschriebenen Transfersomen. Insbesondere unterscheiden sich die Transfersomen der vorliegenden Anmeldung von bekannten Transfersomen dadurch, daß die Transfersomen aus Kombinationen beliebiger Komponenten, unabhängig von ihrer Solubilisierungsfähigkeit, gebildet werden können.

Außerdem weisen die erfindungsgemäßen Transfersomen eine gegenüber den bekannten Transfersomen (cf. Patentanmeldungen WO 92/03122 und EP 475 160 noch verbesserte Stabilität auf, da die Transfersomenzusammensetzung nicht nahe am Solubilisierungspunkt liegt.

Fig. 1 zeigt die Abnahme des Permeationswiderstandes an einer Barriere in Abhängigkeit von der Konzentration randaktiver Substanz bezüglich der Annäherung an den Solubilisierungspunkt bei im Stand der Technik beschriebenen Transfersomen, (wobei jedoch dieser Solubilisierungspunkt nicht erreicht wird).

Fig. 2 zeigt bei erfindungsgemäßen Transfersomen die Abnahme des Permeationswiderstandes an einer Barriere in Abhängigkeit von der Komponenten-Konzentration bezüglich der Annäherung an einen theoretischen, in der Praxis nicht zu erreichenden Solubilisierungspunkt.

Fig. 2 zeigt deutlich, daß für die Komponentensysteme der erfindungsgemäßen Transfersomen keinen Solubilisierungspunkt existiert oder der Solubilisierungspunkt bei Erreichen der maximalen Permeationsfähigkeit noch weit entfernt ist.

Die erfindungsgemäßen Transfersomen öffnen somit einen eleganten, einheitlich und allgemein nützlichen Weg für den Transport von diversen Wirkstoffen in oder durch Permeabilitätsbarrieren. Diese neu entdeckten Wirkstoffträger eignen sich für den Einsatz in Human- und Tiermedizin, Dermatologie, Kosmetik, Biologie, Biotechnologie, Agrartechnologie und in anderen Gebieten.

Ein Transfersom zeichnet sich ferner durch seine Fähigkeit aus, unter der Wirkung eines Gradienten durch und/oder in Permeabilitätsbarrieren zu dringen bzw. diffundieren zu können und dabei Stoffe, insbesondere Wirkstoffe, zu transportieren. Diese Fähigkeit ist insbesondere in der nichtlinearen Permeationsfähigkeit versus Gradient-Kurve leicht zu erkennen und zu quantifizieren.

Ein solches Transfersom setzt sich erfindungsgemäß aus mehreren bis vielen Molekülen zusammen, die physiko-chemisch, physikalisch, thermodynamisch und häufig funktionell eine Einheit bilden. Die optimale Transfersomengröße ist dabei eine Funktion der Barrierecharakteristika. Sie hängt auch von der Polarität (Hydrophilie), Mobilität (Dynamik) und Ladung sowie von der Elastizität der Transfersomen(oberfläche) ab. Ein Transfersom ist vorteilhaft zwischen 10 und 10 000 nm groß.

Für eine dermatologischen Applikationen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Transfersomen in der Größenordnung von 50 bis 10 000 nm, häufig von 75 bis 400 nm, besonders häufig von 100 bis 200 nm verwendet.

Für die Applikationen an Pflanzen werden zweckmäßig zumeist relativ kleine Transfersomen, vorwiegend mit einem Durchmesser unter 500 nm eingesetzt.

Der Vesikelradius der Präparat-Tröpfchen (Transfersomen) beträgt ungefähr von 25 bis 500, vorzugsweise von 50 bis 200 und besonders vorzugsweise von 80 bis 180 nm.

Für erfindungsgemäße Transfersomen aus beliebigen Amphiphilen werden bevorzugt eine oder mehrere Komponenten mit einer Wasserlöslichkeit zwischen  $10^{-10}$  M und  $10^{-6}$  M und ein oder mehrere Komponenten mit einer Wasserlöslichkeit zwischen  $10^{-6}$  M und  $10^{-3}$  M kombiniert. Alternativ kann man die kombinierbaren amphiphilen Komponenten einander auch über ihre HLB-Werte zuordnen, wobei der Unterschied zwischen den HLB-Werten beider Komponenten vorzugsweise bis 10, häufig zwischen 2 und 7 und besonders häufig 3–5 beträgt.

Die Penetrationsfähigkeit der erfindungsgemäßen Transfersomen kann anhand von Vergleichsmessungen gegenüber Referenzteilchen oder Molekülen bestimmt werden. Die verwendeten Referenzteilchen sind deutlich kleiner als die Konstruktionen in der Barriere und somit maximal permeationsfähig. Vorzugsweise soll sich die Transfersomenpermeationsrate durch eine Testbarriere ( $P_{\text{Trans}}$ ) von der Permeationsrate der Vergleichsstoffe  $P_{\text{Refer}}$  (z. B. Wasser), wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, um nicht mehr als einen Faktor zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  unterscheiden. Wenn ein relativ gleichmäßiger und langsamer Materialtransport durch die Barriere gewünscht ist, soll das angegebene Verhältnis zwischen  $10^{-4}$  und 1 liegen. Maximale Penetrationsfähigkeit ist gegeben, wenn das Verhältnis aus  $P_{\text{Trans}}/P_{\text{Refer}}$  größer als  $10^{-2}$  ist. Diese Angaben beziehen sich auf Transfersomen, die die Konstriktion größtmäßig um mehr als einen Faktor 2 und weniger als 4 überragen. Mit zunehmenden Größenunterschied, Träger/Konstriktion, d. h. bei einem Faktor  $> 4$ , können die  $P_{\text{Trans}}/P_{\text{Refer}}$ -Werte entsprechend kleiner sein.

Transfersomen gemäß dieser Anmeldungen können aus einer oder mehreren Komponenten bestehen. Am häufigsten verwendet man ein Gemisch von Grundsubstanzen. Geeignete Grundsubstanzen umfassen Lipide und andere Amphiphile, sowie hydrophile Flüssigkeiten; diese können mit den Wirkstoffmolekülen in bestimmten Verhältnissen gemischt werden, die sowohl von der Wahl der Substanzen als auch von ihren absoluten Konzentrationen abhängig sind.

Allgemein weisen die Präparate einen Gehalt von mindestens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Löslichkeit, zur Bildung einer membranartigen Hülle um eine Tröpfchenmenge hydrophiler Flüssigkeit auf, wobei der Wirkstoff in der membranartigen Hülle, beispielsweise einer Doppelmembran und/oder in der hydrophilen Flüssigkeit enthalten ist. Die Wirkstoff-Träger-Assoziierung kann auch wenigstens teilweise erst nach der Bildung von transfersomenartigen Tröpfchen erfolgen.

Wenn die Transfersomen nicht von sich aus ausreichend deformierbar sind und ihre Permeationsfähigkeit durch den Zusatz von randaktiven Stoffen erreicht werden soll, entspricht die Konzentration dieser Stoffe weniger als 0,1 Mol-% der Menge, die für eine Solubilisierung der Transfersomen erforderlich wäre, oder aber diese Solubilisierung ist im praktisch relevanten Konzentrationsbereich gar nicht erreichbar.

Die erfindungsgemäßen Transfersomen sind zum Wirkstofftransport durch fast beliebige Permeationshindernisse tauglich, z. B. für eine perkutane Medikamentenapplikation. Sie können wasserlösliche, amphiphile oder fettlösliche Agenzien transportieren und erreichen je nach ihrer Zusammensetzung, Applikationsmenge und Form unterschiedliche Penetrationstiefen. Die Spezialeigenschaften, die einen Träger zum Transfersom machen, können sowohl von phospholipidhaltigen Vesikeln, als auch von anderen Amphiphilaggregaten erreicht werden. So kann mittels solcher Transfersomen ein Großteil von Wirkstoffmolekülen nicht nur in die Barriere, z. B. in die Haut, sondern auch durch die Barriere getragen und folglich systemisch aktiv werden. Transfersomen tragen z. B. Polypeptidmoleküle 1000fach effizienter durch die Haut als das bisher mit Hilfe von permeationsfördernden strukturlosen Stoffen möglich war.

## Definitionen

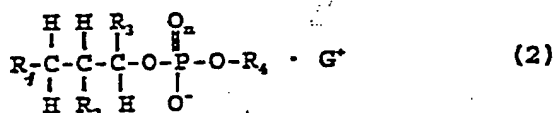
### Lipide

Ein Lipid im Sinne dieser Erfindung ist jede Substanz, die fettartige oder fettähnliche Eigenschaften besitzt. In der Regel besitzt es einen ausgedehnten apolaren Rest (die Kette, X) und zumeist auch einen wasserlöslichen, polaren, hydrophilen Teil, die Kopfgruppe (Y) und hat die Grundformel 1.



worin n größer oder gleich null ist. Lipide mit n = 0 werden als apolare Lipide bezeichnet, Lipide mit n ≥ 1 werden polare Lipide genannt. In diesem Sinn können alle Amphiphile, wie z. B. Glyceride, Glycerophospholipide, Glycerophosphinolipide, Glycerophosphonolipide, Sulfolipide, Sphingolipide, Isoprenoidlipide, Steroide, Sterine oder Sterole und kohlehydrathaltige Lipide allgemein als Lipide bezeichnet werden.

Ein Phospholipid ist beispielsweise eine Verbindung der Formel 2:



worin n und R<sub>4</sub> die unter Formel 2 genannten Bedeutungen haben, aber R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> nicht Wasserstoff, OH oder kurzkettiger Alkylrest sein kann und R<sub>3</sub> meist Wasserstoff oder OH ist. R<sub>4</sub> ist außerdem durch Trikurzkettiges-Alkylammonio, z. B. Trimethylammonio, oder Amino substituiertes kurzkettiges Alkyl, z. B. 2-Trimethylammonioethyl (Cholinyl).

Ein Lipid ist vorzugsweise eine Substanz gemäß der Formel 2, worin n = eins, R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> Hydroxyacyl, R<sub>3</sub> Wasserstoff und R<sub>4</sub> 2-Trimethylammonioethyl (das letztere entspricht der Phosphatidylcholin Kopfgruppe), 2-Dimethylammonioethyl, 2-Methylammonioethyl oder 2-Aminoethyl (entsprechend Phosphatidylethanolaminkopfgruppe) darstellen.

Ein solches Lipid ist z. B. ein natürliches Phosphatidylcholin — veraltet auch Lecithin genannt. Es kann z. B. gewonnen werden aus Ei (reich an Arachidonsäure), Sojabohne (reich an C-18 Ketten), Kokosnuß (reich an gesättigten Ketten), Oliven (reich an einfach ungesättigten Ketten), Safran (Safflor) und Sonnenblumen (reich an n-6 Linoleinsäure), Leinsamen (reich an n-3 Linolensäure), aus Walfett (reich an einfach ungesättigten n-3 Ketten), Nachtkerze oder Primel (reich an n-3 Ketten). Bevorzugte natürliche Phosphatidylethanolamine (veraltet auch Cephaline genannt) stammen häufig aus Ei oder Sojabohnen.

Außerdem sind als Lipide synthetische Phosphatidylcholine (R<sub>4</sub> in der Formel 2 entspricht 2-Trimethylammoniumethyl), synthetische Phosphatidylethanolamine (R<sub>4</sub> gleich 2-Aminoethyl), synthetische Phosphatidsäuren (R<sub>4</sub> ist ein Proton) oder ihre Ester (R<sub>4</sub> entspricht z. B. einem kurzkettigen Alkyl, wie Methyl oder Ethyl), synthetische Phosphatidylserine (R<sub>4</sub> gleich L- oder D-Serin), oder synthetische Phosphatidyl(poly)alkohole, wie z. B. Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol (R<sub>4</sub> gleicht L- oder D-Glycerol) bevorzugt, worin R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> identische Acyloxyreste, z. B. Lauroyl, Oleoyl, Linoyl, Linoleoyl oder Arachinoyl bedeuten, z. B. Dilauroyl-, Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, Distearoyl-, Diarachinoyl-, Dioleoyl-, Dilinoyl-, Dilinolenyl-, Dilinoleoyl-, Dilinolinoyl-, Dilinolenoyl- oder Diarachinoylphosphatidylcholin oder -ethanolamin, oder verschiedene Acylreste, z. B. R<sub>1</sub> = Palmitoyl und R<sub>4</sub> = Oleoyl, z. B. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-glycerophosphocholin; oder verschiedene Hydroxyacylreste, z. B. R<sub>1</sub> = Hydroxypalmitoyl und R<sub>4</sub> = Oleoyl usw. sind. Ferner kann R<sub>1</sub> Alkenyl und R<sub>2</sub> identische (Hydroxy)alkylreste bedeuten, wie z. B. Tetradecylhydroxy oder Hexadecylhydroxy, z. B. in Ditetradecyl- oder Dihexadecylphosphatidylcholin oder -ethanolamin, R<sub>1</sub> kann Alkenyl und R<sub>2</sub> Hydroxyacyl, z. B. ein Plasmalogen (R<sub>4</sub> Trimethylammonioethyl), oder R<sub>1</sub> ein Acyl z. B. Lauryl, Myristoyl oder Palmitoyl und R<sub>2</sub> Hydroxy sein; so z. B. in natürlichen oder synthetischen Lysophosphatidylcholinen oder Lysophosphatidylglycerolen oder Lysophosphatidylethanolaminen, z. B. 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysophosphatidylcholin oder -phosphatidylethanolamin sein; R<sub>3</sub> stellt häufig Wasserstoff dar.

Ein geeignetes Lipid im Sinne dieser Erfindung ist auch ein Lipid der Formel 2, worin n = 1 ist, R<sub>1</sub> einen Alkenylrest, R<sub>2</sub> einen Acylamidorest, R<sub>3</sub> Wasserstoff und R<sub>4</sub> 2-Trimethylammonioethyl (Cholinrest) darstellen. Ein solches Lipid ist unter dem Namen Sphingomyelin bekannt.

Ein geeignetes Lipid ist außerdem ein Lysophosphatidylcholin-Analog, z. B. 1-Lauroyl-1,3-propandiol-

3-phosphorylcholin, ein Monoglycerid, z. B. Monoolein oder Monomyristin, ein Cerebrosid, Ceramidpolyhexosid, Sulfatid, Sphingoplasmaogen, ein Gangliosid oder ein Glycerid, welches keine freie oder veresterte Phosphoryl- oder Phosphonogruppe oder Phosphinogruppe in 3-Stellung enthält. Ein solches Glycerid ist beispielsweise ein Diacylglycerid oder 1-Alkenyl-1-hydroxy-2-acylglycerid mit beliebigen Acyl- bzw. Alkenylgruppen, worin die 3-Hydroxygruppe durch einen der genannten Kohlenhydratreste, z. B. einen Galactosylrest, verestert ist, wie z. B. in einem Monogalactosylglycerin.

Lipide mit erwünschten Kopf- oder Kettengruppen-Eigenschaften können auch auf biochemischem Wege, z. B. mittels Phospholipasen (wie Phospholipase A1, A2, B, C und besonders D), Desaturasen, Elongasen, Acyl-Transferasen usw. aus natürlichen oder synthetischen Prekursoren gebildet werden.

Ein geeignetes Lipid ist ferner ein jedes Lipid, welches in biologischen Membranen enthalten und mit Hilfe von apolaren organischen Lösungsmitteln, z. B. Chloroform, extrahierbar ist. Zu solchen Lipiden gehören außer den bereits erwähnten Lipide beispielsweise auch Steroide, z. B. Oestradiol, oder Sterine, z. B. Cholesterin, beta-Sitosterin, Desmosterin, 7-Keto-Cholesterin oder beta-Cholestanol, fettlösliche Vitamine, z. B. Retinoide, Vitamine, z. B. Vitamin A1 oder A2, Vitamin E, Vitamin K, z. B. Vitamin K1 oder K2 oder Vitamin D1 oder D3 usw.

Die weniger lösliche(n) amphiphile(n) Komponente(n) umfaßt bzw. umfassen vorzugsweise ein synthetisches Lipid wie Myristoleoyl-, Palmitoleoyl-, Petroselinyl-, Petroselaidyl-, Oleoyl-, Elaidyl-, cis- bzw. trans-Vaccenoyl-, Linolyl-, Linolenyl-, Linolaidyl-, Octadecatetraenoyl-, Gondoyl-, Eicosaenoyl-, Eicosadienoyl-, Eicosatrienoyl-, Arachidoyl-, cis- bzw. trans-Docosaenoyl-, Docosadienoyl-, Docosatrienoyl-, Lauroyl-, Tridecanoyl-, Myristoyl-, Pentadecanoyl-, Palmitoyl-, Heptadecanoyl-, Stearoyl- bzw. Nonadecanoyl-, Glycerophospholipid bzw. entsprechend kettenverzweigte Derivate oder ein entsprechendes Dialkyl- bzw. Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes Diacyl- bzw. Dialkyl-Lipid.

Die besser lösliche(n) amphiphile(n) Komponente(n) ist häufig von den oben aufgeführten weniger löslichen Komponenten abgeleitet und zur Erhöhung der Löslichkeit mit einem Butanoyl-, Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl-, Octanoyl-, Nonanoyl-, Decanoyl- oder Undecanoyl-, Substituenten oder mehreren, voneinander unabhängig ausgewählten Substituenten oder mit einem anderen zur Verbesserung der Löslichkeit geeigneten Stoff substituiert und/oder komplexiert, und/oder assoziiert.

Ein geeignetes Lipid ist ferner ein Diacyl- oder Dialkylglycerophosphoethanolaminazopolyethoxylen-Derivat, ein Didecanoylphosphatidylcholin oder ein Diacylphosphooligomaltobionamid.

Als Lipid im Sinne dieser Erfindung gilt auch eine jede andere Substanz (z. B. eine Poly- oder Oligoaminosäure), die eine geringe oder mindestens bereichsweise eine geringe Löslichkeit in polaren Mitteln aufweist.

Alle Tenside ebenso sowie asymmetrische, und daher amphiphile, Moleküle oder Polymere, wie z. B. manche Oligo- und Poly-Kohlenhydrate, Oligo- und Polypeptide, Oligo- und Polynukleotide, viele Alkohole oder Derivate solcher Moleküle gehören in diese Kategorie.

Die Polarität der verwendeten "Lösungsmittel", Tenside, Lipide oder Wirkstoffe hängt von der effektiven, relativen Hydrophilie/Hydrophobie des jeweiligen Moleküls ab, ist aber auch von der Wahl der sonstigen Systemkomponenten und Randbedingungen im System (Temperatur, Salzgehalt, pH-Wert usw.) abhängig. Funktionelle Gruppen, z. B. Doppelbindungen im hydrophoben Rest, welche den hydrophoben Charakter dieses Restes abschwächen, erhöhen die Polarität; Verlängerung oder raumbeanspruchende Substituenten im hydrophoben Rest, z. B. im aromatischen Rest, erniedrigen die Polarität einer Substanz. Geladene oder stark polare Gruppen in der Kopfgruppe, bei gleichbleibender hydrophober Kette, tragen normalerweise zu einer höheren Polarität und Löslichkeit der Moleküle bei. Direkte Bindungen zwischen den lipophilen und/oder amphiphilen Systemkomponenten haben eine entgegengesetzte Wirkung.

Als hochpolare Substanzen sind insbesondere alle in der EP-Patentanmeldung 475 160 als randaktiv genannten Verbindungen geeignet. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

#### Wirkstoffe

Die erfindungsgemäßen Transfersomen eignen sich zur Applikation unterschiedlichster Wirkstoffe, insbesondere z. B. zu therapeutischen Zwecken. So können erfindungsgemäße Präparate insbesondere alle in der EP-Patentanmeldung 475 160 genannten Wirkstoffe enthalten.

Ferner können erfindungsgemäße Präparate als Wirkstoff ein Adrenocortostaticum,  $\beta$ -Adrenolyticum, Androgen oder Antiandrogen, Antiparasiticum, Anabolicum, Anästheticum oder Analgesicum, Analepticum, Antiallergicum, Antiarrhythmicum, Antiarteroscleroticum, Antiasthmaticum und/oder Bronchospasmolyticum, Antibiotikum, Antidepressivum und/oder Antipsychoticum, Antidiabeticum, Antidotum, Antiemeticum, Antiepilepticum, Antifibrinolyticum, Anticonvulsivum, Anticholinergicum, Enzym, Koenzym oder ein entsprechender Inhibitor, ein Antihistaminicum, Antihypertonicum, einen biologischen Aktivitätsinhibitor, ein Antihypotonicum, Antikoagulant, Antimycoticum, Antimyasthenicum, einen Wirkstoff gegen morbus Parkinson oder Alzheimer, ein Antiphlogisticum, Antipyreticum, Antirheumaticum, Antisepticum, Atemanalepticum oder Atemstimulanz, Broncholyticum, Cardiotonicum, Chemotherapeuticum, einen Coronardilatator, ein Cytostaticum, Diureticum, einen Ganglienblocker, ein Glucocorticoid, Grippetherapeuticum, Hämostaticum, Hypnoticum, Immunglobulin bzw. -fragment oder eine andere immunologische bzw. Rezeptor-Substanz, ein bioaktives Kohlehydrat(-derivat), ein Kontrazeptivum, ein Migränemittel, ein Mineralcorticoid, einen Morphin-Antagonisten, ein Muskelrelaxans, Narcoticum, Neural- oder CNS-Therapeuticum, ein Nukleotid, oder Polynukleotid, ein Neurolepticum, einen Neurotransmitter oder entsprechenden Antagonisten, ein Peptid(derivat), ein Ophthalmicum, (Para)-Sympaticomimeticum oder (Para)-Sympathicolyticum, ein Protein(derivat), ein Psoriasis/Neurodermitismittel, Mydriaticum, Psychostimulanz, Rhinologicum, Schlafmittel oder dessen Antagonisten, ein Sedativum, Spasmolyticum,

Tuberlostaticum, Urologicum, einen Vasoconstrictor oder -dilator, ein Virustaticum oder ein Wundenheilmittel oder mehrere solcher Agentien enthalten.

Vorzugsweise ist der Wirkstoff ein nicht-steroidales Antiinflammatoricum, beispielsweise Diclofenac, Ibuprofen oder ein Lithium-, Natrium-, Kalium-, Cäsium-, Rubidium-, Ammonium-, Monomethyl-, Dimethyl-, Trimethyl-Ammonium- oder Ethylammonium-Salz davon.

Außerdem können erfindungsgemäße Präparate als Wirkstoff eine wachstumsbeeinflussende Substanz für Lebewesen, ein Biozid, beispielsweise ein Insektizid, Pestizid, Herbizid, Fungizid, oder einen Lockstoff, insbesondere ein Pheromon aufweisen.

Erfindungsgemäße Präparate können als weniger polare Komponente ein physiologisch verträgliches Lipid, bevorzugt aus der Klasse der Phospholipide, besonders bevorzugt aus der Klasse der Phosphatidylcholine, aufweisen, wobei der Wirkstoff beispielsweise Ibuprophen, Diclofenac oder ein Salz davon, die löslichere Komponente ist, gegebenenfalls mit einem Zusatz von weniger als 10 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung des Präparates einer weiteren löslichen Komponente und wobei die Konzentration der löslicheren Komponente(n) typischerweise zwischen 0,01 Gew.-% und 15 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,1 Gew.-% und 10 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 3 Gew.-%, und die Gesamtlipidkonzentration zwischen 0,005 Gew.-% und 40 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 Gew.-% und 10 Gew.-% beträgt.

Erfindungsgemäße Präparate können zusätzlich Konsistenzbildner, wie Hydrogele, Antioxidantien wie Probuco, Tocopherol, BHT, Ascorbinsäure, Desferroxamin und/oder Stabilisatoren wie Phenol, Cresol, Benzylalkohol und dergleichen umfassen.

Falls nicht anders spezifiziert, können alle angegebenen Substanzen, Tenside, Lipide, Wirkstoffe oder Zusatzstoffe mit einem oder mehreren chiralen Kohlenstoffatomen entweder als racemische Mischungen oder als optisch reine Enantiomere verwendet werden.

#### Wirkprinzip

Im Falle von Permeations-Barrieren kann der Wirkstofftransport durch solche Transfersomen bewältigt werden, die die folgenden Grundkriterien erfüllen:

- Die Transfersomen sollen einen Gradienten spüren oder aufbauen, der sie in oder über die Barriere treibt, z. B. von der Körperoberfläche in und unter die Haut, von der Blattoberfläche in das Blattinnere, von einer Seite der Barriere zur anderen;
- Der Permeationswiderstand, den die Transfersomen in der Barriere spüren, soll möglichst klein sein im Vergleich zu der treibenden Kraft;
- Die Transfersomen sollen fähig sein, in und/oder durch die Barriere zu permeieren, ohne dabei die eingeschlossenen Wirkstoffe unkontrolliert zu verlieren.

Ferner sollen die Transfersomen vorzugsweise eine Kontrolle über die Wirkstoffverteilung, die Wirkstoffeffekte sowie den zeitlichen Wirkungsablauf erlauben. Sie sollen fähig sein, im Bedarfsfall das Material auch in die Tiefe der Barriere und über diese hinweg zu bringen und/oder einen solchen Transport zu katalysieren. Und nicht zuletzt sollen die Transfersomen den Wirkungsbereich und die Wirkungstiefe sowie — in günstigen Fällen — die Art der Zellen, Gewebsteile, Organe, oder Systemabschnitte, die erreicht oder behandelt werden, beeinflussen.

In erster Hinsicht kommen für die biologischen Anwendungen die chemischen Gradienten in Frage. Besonders geeignet sind die physiko-chemischen Gradienten, wie z. B. der (De)Hydratationsdruck (Feuchtigkeitsgradient) oder ein Konzentrationsunterschied zwischen dem Applikations- und Wirkungsort; aber auch elektrische oder magnetische Felder sowie thermische Gradienten sind in dieser Hinsicht interessant. Für technologische Anwendungen sind ferner der applizierte hydrostatische Druck oder ein bestehender Druckunterschied wichtig.

Um die zweite Bedingung zu erfüllen, müssen die Transfersomen auf der mikroskopischen Skala ausreichend "dünnflüssig" sein, d. h. eine hohe mechanische Elastizität und Verformbarkeit und eine ausreichend niedrige Viskosität; nur dann können sie durch die Konstruktionen innerhalb der Permeabilitätsbarriere gelingen.

Der Permeationswiderstand nimmt verständlicherweise mit der Trägergröße ab. Aber auch die treibende Kraft ist häufig von der Trägergröße abhängig; bei größenunabhängigem Druck nimmt diese Kraft mit der Größe typischerweise ab. Darum ist die Übertragungseffizienz keine einfache Funktion der Größe, sondern weist häufig ein von der Wahl der Träger- und Wirkstoffe abhängiges Maximum auf.

Ferner spielt die Wahl der Trägersubstanzen, Wirkstoffe und Zusatzstoffe, sowie die applizierte Trägermenge oder Konzentration eine Rolle. Niedrige Dosierung führt meistens zu einer oberflächlichen Behandlung: Stoffe, die schlecht wasserlöslich sind, bleiben dabei zumeist in der apolaren Region der Permeabilitätsbarriere (z. B. in den Membranen der Epidermis) hängen; gut lösliche Wirkstoffe, die leicht aus den Trägern diffundieren, können eine andere Verteilung haben als die Träger; für solche Stoffe ist also auch die Durchlässigkeit der Transfersomen-Membran wichtig. Substanzen, die dazu neigen, aus den Trägern in die Barriere überzutreten, führen zu einer örtlich variablen Trägerzusammensetzung, usw. Diese Zusammenhänge sollen vor jeder Applikation überdacht und berücksichtigt werden. Bei der Suche nach Bedingungen, unter denen die einfachen Trägers vesikel zu Transfersomen werden, kann die folgende Faustregel verwendet werden.

- Als erstes werden zwei oder mehrere amphiphile Komponenten kombiniert, die sich in ihrer Löslichkeit im vorgesehenen Suspensionsmedium der Transfersomen, üblicherweise Wasser oder ein anderes polares, meist wäßriges Medium, um einen Faktor 10 bis  $10^7$ , vorzugsweise  $10^2$  und  $10^6$  und besonders bevorzugt

zwischen  $10^3$  und  $10^5$  unterscheiden, wobei die weniger lösliche Komponente eine Löslichkeit von  $10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  und die besser lösliche Komponente eine Löslichkeit im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  M aufweist. Die Löslichkeit der entsprechenden Komponenten, wenn nicht aus allgemein üblichen Nachschlagewerken bekannt, läßt sich beispielsweise durch herkömmliche Methoden zur Bestimmung der Sättigungsgrenze bestimmen.

— Als nächstes wird die Trägerzusammensetzung bzw. Konzentration der Komponenten im System so angepaßt, daß die Vesikel sowohl eine ausreichende Stabilität als auch eine ausreichende Deformierbarkeit, und daher zweckmäßige Permeationsfähigkeit, aufweisen. Unter Stabilität wird in dieser Anmeldung neben dem mechanischem "Zusammenhalt" auch verstanden, daß sich die Substanz-, insbesondere der Wirkstoffgehalt der Trägerzusammensetzung beim Transport, insbesondere beim Permeationsvorgang, nicht oder nicht wesentlich ändert. Die Position des gesuchten Optimums ist dabei von der Wahl der Komponenten abhängig.

— Abschließend werden die Systemparameter unter Berücksichtigung der angestrebten Applikationsmodi und Ziele nachoptimiert. Für eine rasche Wirkung ist hohe Permeationsfähigkeit erforderlich; für langsame Wirkstofffreisetzung eine allmähliche Barrieren-Penetration und entsprechend eingestellte Membranpermeabilität vorteilhaft; für die Tiefenwirkung ist eine hohe Dosis, für möglichst breite Verteilung eine nicht zu hohe Trägerkonzentration angeraten.

— Der Gehalt an amphiphilen Komponenten wird insbesondere so eingestellt, daß die Fähigkeit des Transfersomen-Präparates, durch Konstruktionen zu permeieren mindestens 0,01 Tausendstel der Permeabilität von kleinen Molekülen (beispielsweise Wasser) beträgt. Die Penetrationsfähigkeit der erfindungsgebißenen Transfersomen kann anhand von Vergleichsmessungen gegenüber Referenzteilchen oder Molekülen bestimmt werden. Die verwendeten Referenzteilchen sind deutlich kleiner als die Konstruktionen in der Barriere und somit maximal permeationsfähig. Vorzugsweise soll die Transfersomenpermeationsrate durch eine Testbarriere ( $P_{\text{Transf}}$ ) und die Permeationsrate der Vergleichsstoffe ( $P_{\text{Refer}}$ ) (z. B. Wasser) wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, sich um nicht mehr als um einen Faktor zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-3}$  unterscheiden.

In dieser Anmeldung werden relevante Eigenschaften von Transfersomen als Träger für die Lipidvesikel besprochen. Die meisten Beispiele beziehen sich beispielhaft auf die Träger aus Phospholipiden, wobei jedoch die allgemeine Gültigkeit der Schlußfolgerungen nicht auf diese Trägerklasse oder Moleküle beschränkt ist. Die Lipidvesikel-Beispiele illustrieren lediglich die Eigenschaften, die zur Penetration durch die Permeabilitätsbarrieren, wie z. B. Haut, benötigt werden. Dieselben Eigenschaften ermöglichen einen Trägertransport auch durch die tierische oder menschliche Epidermis, Schleimhäute, pflanzliche Kuticula, anorganische Membranen, usw.

Der wahrscheinliche Grund für die spontane Permeation von Transfersomen durch die "Poren" in der Hornhautzellschicht ist, daß diese auf einer Seite in einem wäßrigen Kompartiment, der Subcutis, münden; die Transfersomen werden dabei durch den osmotischen Druck getrieben. Alternativ kann aber zusätzlich ein externer, z. B. hydrostatischer oder elektro-osmotischer Druck appliziert werden.

Je nach Vesikelmenge können nach einer perkutanen Applikation die Lipidvesikel bis in die Subkutis gelangen. Die Wirkstoffe werden dabei, je nach der Größe, Zusammensetzung und Formulierung der Träger oder Agenzien, entweder lokal freigesetzt, proximal angereichert, oder aber über die Lymphgefäße bzw. Blutgefäße weitergeleitet und über den Körper verteilt.

Manchmal ist es angebracht, den pH-Wert der Formulierung gleich nach der Herstellung oder unmittelbar vor der Anwendung anzupassen. Eine solche Anpassung soll die Zerstörung der Systemkomponenten und/oder der Wirkstoffträger unter den anfänglichen pH-Bedingungen verhindern und die physiologische Verträglichkeit der Formulierung gewährleisten. Zur Neutralisierung werden zumeist physiologisch verträgliche Säuren oder Basen bzw. Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 3–12, vorzugsweise 5 bis 9, besonders häufig 6–8, je nach dem Zweck und Ort der Applikation, verwendet. Physiologisch verträgliche Säuren sind beispielsweise verdünnte wäßrige Mineralsäuren, wie z. B. verdünnte Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure, oder organische Säuren, z. B. Alkylcarbonsäuren, wie Essigsäure. Physiologisch verträgliche Laugen sind z. B. verdünnte Natronlauge, entsprechend ionisierte Phosphorsäure, usw.

Die Herstellungstemperatur wird normalerweise den eingesetzten Substanzen angepaßt und liegt für die wäßrige Präparationen üblicherweise zwischen 0 und 95°C. Vorzugsweise arbeitet man in einem Temperaturbereich von 18–70°C; besonders bevorzugt für die Lipide mit fluiden Ketten ist der Temperaturbereich zwischen 15 und 55°C, für die Lipide mit geordneten Ketten zwischen 45 und 60°C. Andere Temperaturbereiche sind für die nichtwäßrigen Systeme oder für Präparationen, die Kryo- oder Hitzekonservantien enthalten, bzw. die in situ hergestellt werden, möglich.

Falls die Empfindlichkeit der Systemkomponenten das verlangt, können die Formulierungen kühl (z. B. bei 4°C) gelagert werden. Sie können auch unter Inertgas-, z. B. Stickstoffatmosphäre, hergestellt und aufbewahrt werden. Die Lagerungsdauer kann durch die Verwendung von Substanzen ohne Mehrfachbindungen sowie durch das Eintrocknen und Verwendung von Trockensubstanz, die erst an Ort und Stelle aufgelöst und aufgearbeitet wird, weiter erhöht werden, insbesondere können die transfersomenartigen Tröpfchen kurz vor der Anwendung aus einem Konzentrat oder Lyophilisat zubereitet werden.

In den meisten Fällen findet die Applikation der Träger bei Raumtemperatur statt. Einsätze bei tieferen Temperaturen oder bei höheren Temperaturen mit synthetischen Substanzen noch höhere Temperaturen sind indes durchaus möglich.

Die Herstellung einer Transfersomensuspension kann mittels mechanischer, thermischer, chemischer oder elektrischer Energiezufuhr erfolgen. So kann eine Transfersomenherstellung auf Homogenisierung oder Rühren basieren.



Eine Bildung von transfersomenartigen Tröpfchen kann durch Filtration bewirkt werden. Das dafür verwendbare Filtermaterial sollte eine Porengröße von 0,01 bis 0,8 µm, insbesondere 0,05 bis 0,3 µm und besonders bevorzugt 0,08 bis 0,15 µm aufweisen, wobei gegebenenfalls mehrere Filter hintereinandergeschaltet verwendet werden.

Die Präparate können im voraus oder an Ort und Stelle der Anwendung vorbereitet werden, wie das anhand mehrerer Beispiele im Handbuch "Liposomes" (Gregoriadis, G., Hrsg., CRC Press, Boca Raton, FL, Vols 1—3, 1987) im Buch "Liposomes as drug carriers" (Gregoriadis, G., Hrsg., John Wiley & Sons, New York, 1988), oder im Laboratoriumshandbuch "Liposomes. A Practical Approach" (New, R., Oxford-Press, 1989) beschrieben ist. Falls erforderlich, kann eine Wirkstoffsuspension unmittelbar vor dem Gebrauch verdünnt oder aufkonzentriert (z. B. per Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration) bzw. mit weiteren Zusatzstoffen vermennt werden. Dabei muß jedoch die Möglichkeit einer Verschiebung des Optimums für die Trägerpermeation ausgeschlossen oder einkalkuliert werden.

Die Transfersomen gemäß dieser Anmeldung sind als Träger von lipophilen Stoffen, z. B. fettlöslichen biologischen Wirkstoffen, Therapeutika und Giften, usw. geeignet; von einem großen praktischen Wert ist auch ihre Anwendung im Zusammenhang mit amphiphilen wasserlöslichen Substanzen, besonders wenn deren Mol-Masse größer als 1000 ist.

Die Transfersomen können ferner zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Stoffen beitragen und eine verbesserte Verteilung von Agentien in der Probe und am Ort der Applikation ermöglichen, sowie einen günstigeren zeitlichen Verlauf der Wirkstoffwirkung gewährleisten. Die Grundsubstanz, aus der die Transfersomen bestehen, kann selbst eine vorteilhafte Wirkung haben. Die wichtigste Trägereigenschaft ist jedoch, den Materialtransport in und durch die Permeabilitätsbarriere zu ermöglichen.

Die beschriebenen Formulierungen sind erfindungsgemäß optimiert für die topische Applikation an — oder in der Nähe von — Permeabilitätsbarrieren. Besonders interessant dürfte das Auftragen auf die Haut oder auf die pflanzliche Kutikula sein. (Sie sind aber auch für eine orale (p.o.) oder parenterale (i.v. im. oder i.p.) Applikation gut geeignet, besonders wenn die Transfersomenzusammensetzungen so gewählt sind, daß die Verluste am Applikationsort klein sind.) Substanzen bzw. Komponenten, die am Applikationsort bevorzugt abgebaut, besonders stark aufgenommen oder verdünnt werden, sind in letzter Hinsicht in Abhängigkeit vom Einsatzzweck besonders wertvoll.

Im medizinischen Bereich werden bevorzugt bis zu 50, häufig bis zu 10, besonders häufig weniger als 2,5 oder sogar weniger als 1 mg Trägersubstanz pro cm<sup>2</sup> Hautfläche aufgetragen; die optimale Menge hängt ab von der Trägerzusammensetzung, angepeilten Wirtiefe und Wirkdauer, sowie von dem Applikationsort. Im agrotechnischen Bereich liegen Applikationsmengen typischerweise niedriger, häufig unter 0,1 g pro m<sup>2</sup>.

Insbesondere beträgt der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz zur Applikation auf menschlicher und tierischer Haut zwischen 0,01 und 40 Gew.-% des Transfersoms, vorzugsweise zwischen 0,1 und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 und 10 Gew.-%.

Zur Applikation bei Pflanzen beträgt der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz 0,000001 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise zwischen 0,001 und 1 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-%.

Je nach der angestrebten Anwendung können die Formulierungen erfindungsgemäß auch geeignete Lösungsmittel bis zu einer Konzentration, die durch die jeweilige physikalische (keine Solubilisierung oder nennenswerte Optimumverschiebung), chemische (keine Beeinträchtigung der Stabilität), oder biologische bzw. physiologische (wenig unerwünschte Nebeneffekte) Verträglichkeit bestimmt wird.

Vorzugsweise kommen dabei unsubstituierte oder substituierte, z. B. halogenierte, aliphatische, cycloaliphatische, aromatische oder aromatisch-aliphatische Kohlenwasserstoffe, z. B. Benzol, Toluol, Methylchlorid oder Chloroform, Alkohole, z. B. Methanol oder Ethanol, Butanol, Propanol, Pentanol, Hexanol oder Heptanol, Propandiol, Erithritol, Niederalkancarbonsäureester, z. B. Essigsäurealkylester, Ether wie z. B. Diethylether, Dioxan oder Tetrahydrofuran, oder Mischungen dieser Lösungsmittel, in Frage.

Übersichten der Lipide und Phospholipide, die zusätzlich zu den vorstehend genannten für eine Verwendung im Sinne dieser Anmeldung geeignet sind, sind in "Form and Function of Phospholipids" (Ansell & Hawthorne & Dawson, Verfasser), "An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty acids and Their Glycerides" von Gunstone und in anderen Übersichtswerken enthalten. Die erwähnten Lipide und Tenside sowie andere, in Frage kommende randaktive Stoffe, und ihre Herstellung, sind bekannt. Ein Überblick der käuflich erhältlichen polaren Lipide, sowie die Warenzeichen, unter denen diese von den Herstellerfirmen vertrieben werden, ist im Jahrbuch "Mc Cutcheon's, Emulsifiers & Detergents", Manufacturing Confectioner Publishing Co, angegeben. Ein aktuelles Verzeichnis der pharmazeutisch akzeptablen Wirkstoffe ist z. B. dem "Deutschen Arzneibuch" (und der jeweiligen Jahresausgabe der "Rote Liste"), ferner aus British Pharmaceutical Codex, European Pharmacopoeia, Farmacopoeia Ufficiale della Repubblica Italiana, Japanese Pharmacopoeia, Nederlandse Pharmacopoeia, Pharmacopoeia Helvetica, Pharmacopoeie Francaise, The United States Pharmacopoeia, The United States NF, usw., entnehmbar. Ein ausführliches Verzeichnis der erfindungsgemäß geeigneten Enzyme ist in dem Band "Enzymes", 3rd Edition (M. Dixon und E.C. Webb, Academic, San Diego, 1979) enthalten, aktuelle Neuentwicklungen sind der Reihe "Methods in Enzymology" zu entnehmen. Zuckererkennende Proteine, die im Zusammenhang mit dieser Erfindung interessant sind, sind in dem Buch "The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine" (I.E. Liener, N. Sharon, I.T. Goldstein, Eds. Academic, Orlando, 1986) sowie in aktuellen Fachpublikationen beschrieben; Agrotechnisch interessante Substanzen sind in "The Pesticide Manual" (C.R. Worthing, S.B. Walker, Eds. British Crop Protection Council, Worcestershier, England, 1986, z. B. 8th edition) und in "Wirkstoffe in Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfung", herausgegeben durch den Industrie-Verband Agrar (Frankfurt) angeführt; käuflich erhältliche Antikörper sind in dem Katalog "Linscott's Directory", die wichtigsten Neuropeptide in "Brain Peptides" (D.T. Krieger, M.J. Brownstein, J.B. Martin, Eds. John Wiley, New York, 1983), entsprechenden Ergänzungsbänden (z. B. 1987) und anderen Fachpublikationen aufgelistet.

Herstellungstechniken für Liposome, die sich überwiegend auch für die Herstellung von Transfersomen eignen, sind in "Liposome Technology" (Gregoriadis, Ed., CRC Press) oder in älteren Nachschlagewerken, z. B. in "Liposomes in Immunobiology" (Tom & Six, Eds., Elsevier), in "Liposomes in Biological Systems" (Gregoriadis & Allison, Eds., Wiley), in "Targeting of Drugs" (Gregoriadis & Senior & Trouet, Plenum), usw., sowie in der einschlägigen Patentliteratur beschrieben.

Die Stabilität und Permeationsfähigkeit von Transfersomen kann mittels Filtration, ggf. unter Druck, durch ein feinporiges Filter oder durch anderweitige kontrollierte mechanische Aufwirbelung, Scherung oder Zerkleinerung bestimmt werden.

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, ohne sie zu beschränken. Temperaturen sind in Grad Celsius, Trägergrößen in Nanometer, Drucke in Pascal und sonstige Größen in üblichen SI Einheiten angegeben.

Verhältnis- und Prozentangaben sind molar, sofern nicht anders angegeben. Meßtemperatur ist ca. 21°C, wenn nicht anders angegeben.

#### Beispiele 1—4

#### Zusammenfassung

0—500 mg Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen CMC  $\approx 10^{-7}$  M (ca. 98% PC = SPC),  
0—500 mg Distearoylglycerophosphoethanolamintriazopolyethoxylan (5000), CMC =  $10^{-5}$  M,  
4.50 ml Puffer, pH 7,3.

#### Herstellung

Es werden Gemische von SPC (angenommene Molmasse: 800 Da) mit zunehmenden Mengen 0, 30 und 40 Mol-% DSPE-PEG (angenommene Molmasse: 5800 Da) und reine DSPE-PEG Liposomen ohne einen Gehalt an SPC hergestellt. Anschließend werden die jeweiligen erhaltenen Gemische in einer Chloroform-Methanol-Lösung gelöst. Danach wird die Lipid-Lösung in ein Rundkolbengefäß übertragen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer bleibt ein dünner Lipidfilm an der Kolbenwand zurück. Dieser Film wird im Vakuum (unter 10 Pa) weitergetrocknet, anschließend durch Pufferzugabe hydratisiert und durch mechanisches Rühren suspendiert. Es wird eine trübe Suspension erhalten, die in der Regel sehr viskos ist. Die Größe der Teilchen in der resultierenden Suspension wird mittels dynamischer Lichtstreuung sowie mittels optischer Mikroskopie bestimmt. Die beobachtete Teilchengröße war in allen Fällen immer größer als 0,5  $\mu\text{m}$ . Anhand der dynamischen Lichtstreuung läßt sich daher für die untersuchten Gemische eine Micellenbildung und folglich auch eine Solubilisierung ausschließen.

Die Liposomen für die Vergleichsversuche werden nach einem analogen Verfahren aus reinem Phosphatidylcholin hergestellt.

#### Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit

Eine Trägersuspension wird unter einem gegebenen äußeren Druck durch die Konstruktionen in einer künstlichen Permeationsbarriere getrieben. Die Materialmenge, die pro Zeiteinheit durch die Verengung kommt, wird volumetrisch oder gravimetrisch bestimmt. Aus der Gesamtfläche (Auftragsfläche des Materials), dem (Antriebs)Druck, der Zeit und der Penetratmenge wird die Permeationsfähigkeit (P) der Suspension im jeweiligen untersuchten System wie folgt berechnet:

$$P = \frac{\text{Penetratmenge}}{\text{Zeit} \times \text{Fläche} \times \text{Antriebsdruck}}$$

Die Messung wird unabhängig für mehrere Drucke wiederholt. Aus den Ergebnissen solcher Messungen wird die relative Abhängigkeit der Permeationsfähigkeit, was ein Maß für die Trägerdeformierbarkeit ist, in Abhängigkeit vom mechanischen Streß bzw. Druck berechnet. Der Wert für eine reines SPC enthaltende hydratisierte 1%ige Lösung beträgt bei einem Druck von 0,3 MPa ungefähr  $> 0,01 \mu\text{l}/\text{MPa} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^2$  (siehe Fig. 3).

Die Permeationsfähigkeitsmessung für solche Versuchsreihen erfolgt bei 62°C, damit sichergestellt ist, daß beide Lipide als fluide Phase vorliegen.

Die Ergebnisse einer solchen Meßreihe für die Beispiele 1—4 sind in der Tabelle 1 dargestellt. Tabelle 1 zeigt, daß die Permeationsfähigkeit mit steigendem Antriebsdruck stark, nicht linear ansteigt und bei hohen Tröpfchenbelastungen (0,7 MPa) um mehrere Größenordnungen über dem Wert liegt, der sich bei einer niedrigeren Belastung (0,3 MPa) ergibt. Ein derartiger ausgeprägter nichtlinearer Zusammenhang gilt jedoch ausschließlich (im Sinne eines Unterscheidungskriteriums) für Transfersomen und nicht für Liposomen. Aus der Fig. 3 geht deutlich hervor, daß der Wert der Permeationsfähigkeit für die letztgenannten im Vergleich zu Transfersomen um mehrere Größenordnungen kleiner. Dieser Unterschied der Permeationsfähigkeit zwischen Transfersomen und Liposomen zeigt deutlich die gegenüber Liposomen signifikant gesteigerte Penetrationsfähigkeit.

Tabelle 1

Proben- beschrei- bung	Druck	Perme- ations- fähigkeit	Ausgangs- größe	Endgröße	
	(MPa)	( $\mu\text{l}/\text{MPa}$ $\text{s cm}^2$ )	(nm)	(nm)	
SPC/DSPE	0,7	21,3	225,7	92,6	15
- PEG					
70/30	0,6	18,7		94,5	
mol%					20
10% Lipidlsg.	0,5	10,9		96,1	
rehydratisierte	0,4	2,8		96,1	
Probe	0,3	0,007		100,5	25
SPC/DSPE	0,7	12,2	217,3	96,3	
-PEG					
60/40 mol%	0,6	13,2		100,7	30
10% Lipidlsg.	0,5	12,2		120	
rehydratisierte	0,4	3,39		99,1	
Probe	0,3	0,002		wenig Filtrat	35
Beispiele 5—6					40
Zusammensetzung					
410,05 mg, 809,25 mg Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen (reiner als 95%) CMC $\approx 10^{-7}$ M, 289,95 mg, 190,75 mg Didecanoylphosphatidylcholin CMC $\approx 10^{-6}$ , 7 ml, 10 ml Puffer, pH 7,3.					45
Herstellung					
Der jeweilige Lipidgehalt wird so gewählt, daß in der endgültigen Formulierung beide Lipid-Komponenten in einem Molverhältnis von 1/1 bzw. 3/1 vorliegen. Die entsprechenden Substanzmengen Phosphorlipid werden in einem 50 ml Rundkolben eingewogen und in jeweils 1 ml Chloroform/Methanol 1 : 1 gelöst. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer wird, wie in den Beispielen 1—4 zuvor beschrieben, eine Suspension aus dem Film erhalten, die Träger mit einem mittleren Radius von ungefähr 450 nm aufweist.					50
Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit					55
Die Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit wird nach dem in den Beispielen 1—4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Fig. 4 dargestellt. Sie zeigen, daß ein Zusatz von Didecanoylphosphatidylcholin die Permeationsfähigkeit der Träger, in Abhängigkeit von der Konzentration, signifikant erhöht, insbesondere bei hohem Druck. Die aus SPC und Didecanoylphosphatidylcholin in einem Molverhältnis von 1/1 gebildeten Träger (davon ausgenommen die Träger mit einem Molverhältnis von 3/1) haben eine signifikant höhere Permeationsfähigkeit als aus reinem SPC gebildete Liposomen.					60
Die Werte der Permeationsfähigkeit für die gemessenen Träger der Beispiele 5—6 sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.					65
Die reines Didecanoylphosphatidylcholin enthaltende 10%ige Suspension ist milchig trüb. Diese Suspension enthält Träger mit einem mittleren Durchmesser von $700 \pm 150$ nm und bildet einen Bodensatz aus. Dieses Verhalten zeigt deutlich, daß das Lipid weder per se noch in Kombination mit SPC im relevanten Konzentra-					

tionsbereich solubilisierbar ist.

Tabelle 2

5	Probenbeschreibung	Porendurch- messer (nm)	Druck (MPa)	Permeations- fähigkeit
10	Probe: 3 : 1	50	0,9	0,00039
		100	0,5	0,0083
			0,6	0,021
			0,7	0,04
15			0,8	0,05
			0,9	0,066
20	Probe: 1 : 1	50	0,9	0,16
		100	0,5	0,052
				0,021
25			0,6	0,12
				0,17
			0,7	0,27
30				0,22
			0,8	0,76
				0,69
			0,9	0,66
35				0,60

## Beispiel 7

40 345,6 mg Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen (reiner als 95%, PC), CMC =  $10^{-7}$  M,  
154,4 mg Distearoylphosphomaltobionamid CMC  $\leq 10^{-5}$  M,  
4,5 ml Puffer, pH 7,3.

45 Es wird gemäß dem für die Beispiele 5—6 beschriebenen Verfahren eine Suspension aus SPC/DSPE-Malto-  
bionamid in einem Molverhältnis 3 : 1 hergestellt. Die resultierenden Träger weisen eine außergewöhnlich gute  
Permeationsfähigkeit auf. Bei der Bestimmung der Permeationsfähigkeit wird vor und nach jeder Messung die  
Größe der Träger bestimmt. Die Messungen dienen dem Nachweis, daß zu keinem Zeitpunkt eine Solubilisie-  
rung der Träger auftritt.

50 Die Permeationsfähigkeit der Träger wird bei einem Druck von 0,4 MPa und im Gegensatz zu den Beispielen  
5 und 6 bei einer Temperatur von 52°C ermittelt. Bei diesem Druck ist die durch die künstliche Permeationsbar-  
riere beobachtete Trägerpermeation ausreichend gut. Das zugesetzte Lipid (Glyko-Lipid) ist zur Solubilisierung  
des Phospholipids nicht fähig. Eine Untersuchung der Suspension mittels dynamischer Lichtstreuung sowie  
mittels optischer Mikroskopie gibt keinen Hinweis auf die Existenz einer solubilisierten (mizellaren) Phase. Die  
55 Endgröße der Teilchen beträgt nach der Permeation durch die künstliche Permeabilitätsbarriere in Abhängig-  
keit vom Antriebsdruck (0,3—0,9 MPa; mit steigendem Druck, Tendenz fallend) zwischen 98 und 81 nm.

Reines Glykolipid geht weder in Lösung noch entsteht eine Mizellensuspension, sondern es bildet sich eine  
Vesikelsuspension aus. Um das zu belegen, wurde ein Versuch unternommen, womit die osmotische Aktivität  
von DSPE im wäßrigen Medium nachgewiesen werden kann. Hierfür wurde die Lipidsuspension mit Wasser  
60 verdünnt. Aufgrund des dadurch entstehenden Konzentrationsgefälles kommt es zum Eintritt von Wasser in die  
Vesikel. Als unmittelbare Folge nimmt der mittlere Vesikelradius meßbar zu. Dagegen verändern Teilchen ohne  
Innenvolumen (z. B. Mischmizellen) unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ihre Größe nicht.

## Beispiele 8—17

65

## Zusammensetzung

203—86,5 µl Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen (als eine 1 : 1 Masse/V SPC-Lösung in absolutem Ethanol),

CMC(in Wasser)  $\approx 10^{-7}$  M,  
9.04–61.4 mg Diclofenac, Löslichkeit  $\leq 10^{-5}$  M,  
1 ml Phosphatpuffer (nominal: pH 6,5).

Die Träger werden nach dem in den Beispielen 1–4 beschriebenen Verfahren als SPC-/Diclofenac-Gemischen in einem Molverhältnis von 4 : 1 bis 1 : 4 hergestellt.

Die so erhaltenen Gemische werden einer Ultraschallquelle solange ausgesetzt, bis die Proben makroskopisch klar sind (ungefähr 4 Minuten). Danach werden die Lösungen 15 min bei 15 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die resultierenden Lösungen 1 : 1–1 : 4 sind nicht klar (Fig. 5), sondern zeigen eine Opaleszenz. Dagegen weisen die Gemische 4 : 1, 3 : 1 und 2 : 1 einen deutlichen Niederschlag auf. Nach 5-minütigen Stehenlassen trüben auch die anderen Suspensionen ein, wobei bei den Gemischen 1 : 2, 1 : 3 und 1 : 4 ein flockiger Niederschlag ausfällt (Tabelle 3). Dieses Verhalten zeigen die Präparate auch nach Einstellen des pH's (mit HCl) auf Werte zwischen pH 7–pH 7,2.

#### Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit

Die Träger-Permeationsfähigkeit, die ein Maß für die Trägerdeformierbarkeit ist, wird wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben, bestimmt. Dabei wird für die Gemische mit 15 mg/ml, 20 mg/ml und 25 mg/ml Diclofenac bei einem Druck von 0,3 MPa (Antriebsdruck) folgende Permeabilitätswerte (P) erhalten:  $6 \times 10^{-11}$  m/Pa/s,  $10^{-10}$  m/Pa/s und  $2,5 \times 10^{-10}$  m/Pa/s.

Diese Werte sind mit denen bekannter Transfersomen, die unter ähnlichen Bedingungen gemessen wurden (SPC/NaChol 3/1 M/M; 2 Gew.-%:  $3 \times 10^{-10}$  m/Pa/s), vergleichbar. Das belegt, daß SPC/Diclofenac-Gemische geeigneter Zusammensetzung eine sehr hohe Permeationsfähigkeit aufweisen und folglich extrem deformierbar sein müssen, obwohl sie zu keinem Zeit- oder Konzentrationspunkt solubilisierbar sind.

Tabelle 3

Mit HCl wird der pH auf 7 - 7,2 pH eingestellt und 2 min beschallt.

Nach Beschallen:	1:1.0	leicht trüb	
	1:1.2	trüb, flüssig, Kristalle in Lsg. ca. 20 pro Sichtfeld	35
	1:1.4	trüb, flüssig, Kristalle in Lsg. ca. 20 pro Sichtfeld	40
	1:1.6	trüb, flüssig, Kristalle etwas größer	45
	1:1.8	trüb, zähflüssig, Zusammenballung von Kristallen	
	1:2.0	trüb, zähflüssig, sehr viele Kristalle	50
	1:2.2	trüb, zähflüssig, sehr viele, sehr große Kristalle	55

#### Beispiele 18–25

#### Zusammensetzung

475–325 mg Phosphatidylcholin aus Soja-Bohnen, CMC  $\approx 10^{-7}$  M,  
25–175 mg Ibuprofen, Löslichkeit  $\leq 5 \times 10^{-5}$  M,  
5 ml Puffer, pH 6,5.

## Herstellung

Die Herstellung erfolgt wie in den Beispielen 1—4 beschrieben, mit der Ausnahme, daß der pH-Wert nach Suspensierung des Gemisches durch Zugabe von 10 M NaOH auf pH 7 eingestellt wird. Es werden jeweils 5 ml ibuprofenhaltige Transfersomen mit zunehmender Menge an Ibuprofen und abnehmender Menge an SPC (in 25 mg-Schritten) hergestellt, worin die Gesamtlipidkonzentration 10% beträgt.

## Mikroskopische Kontrolle der erhaltenen Suspensionen

- 10 Probe 1: keine Kristalle, sehr große Träger;  
 Probe 2: keine Kristalle, sehr große Träger;  
 Probe 3: im Hintergrund nur Flimmern;  
 Probe 4: sehr vereinzelt kleine Kristalle;  
 Probe 5: keine Kristalle, Tröpfchen;  
 15 Probe 6: überwiegend Kristalle;  
 Probe 7: Tröpfchen, vereinzelt sehr große Kristalle.

## Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit

20 Die Bestimmung der Träger-Permeationsfähigkeit wird, wie in den vorherigen Beispielen beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in den Fig. 6 und 7 dargestellt. Die untersuchten Phospholipid-Wirkstoffgemische zeigen durchgehend insbesondere aber im Konzentrationsbereich von 35 mg Ibuprofen/ml und darüber, ein für Transfersomen typisches Verhalten. Die Ibuprofen-Konzentration der Träger bewirkt keine Solubilisierung.

## 25 Vergleichsbeispiele A—E

## Vergleichsbeispiel A (Beispiel 2 aus EP-A 0 211 647)

## 30 Zusammensetzung

- 120 mg Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)  
 24 mg Ölsäure  
 20 mg Arginin  
 35 60 ml PBS (eine Tablette in 200 ml dest. Wasser auflösen)

Es wurden 120,0 mg DPPC und 24,1 mg Ölsäure in ein 100 ml Becherglas eingewogen. Anschließend wurden die beiden Reagenzien vermischt. Eine Phosphatpuffersalz (PBS)-Tablette wurde in 200 ml dest. Wasser vollständig aufgelöst, um einen 10 mM (PBS)-Puffer zu erhalten. Dann wurden 20 mg Arginin in 60 ml PBS, mit einem pH-Wert 7,46 gelöst und dem Lipid-Gemisch zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde für eine halbe Stunde auf 40—45°C erhitzt und homogen verrührt.

## Vergleichsbeispiel B (Beispiel 9 aus EP-A 0 280 492)

- 45 270 mg Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)  
 30 mg DSPC  
 60 mg 1-Octadecansulfonsäure (ODS)

Es wurden 270,05 mg (DPPC), 30,1 mg DSPC und 60,01 mg 1-Octadecansulfonsäure (ODS) in Chloroform/Methanol 1 : 1 gelöst. Die Probe wurde für zwei Stunden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde im Vakuum noch für eine Stunde nachgetrocknet. Der Rückstand wurde mit 10 ml PBS rehydriert. Die Mischung wurde auf 60°C erwärmt und homogenisiert. Danach wurde die Probe für 5 Minuten einer Ultraschallquelle ausgesetzt.

## 55 Vergleichsbeispiel C (Beispiel 7 aus WO 88/07362)

## Zusammensetzung

- 400 mg Setacin F spezial-Paste (Disodiumlaurylsulfosuccinat)  
 60 580 mg hydrogeniertes PC (PHPC)  
 200 mg Minoxidil, Acetatpuffer pH 5,5

Es wurden 400 mg Setacin F spezial-Paste, 580,03 mg PHPC und 200,03 mg Minoxidil in einem Becherglas eingewogen und mit Chloroform/Methanol 1 : 1 gelöst und in einen Rundkolben überführt. Das Lipidgemisch wurde am Rotationsverdampfer für ca. 2,5 Stunden eingengt und anschließend im Vakuum vollständig getrocknet. Dann wurde die Probe bei 50°C im warmen Wasserbad geschwenkt und mit 10 ml Acetatpuffer rehydratisiert. Nach vollständiger Lösung wurde die Lösung für eine Stunde im Wasserbadschüttler stehen gelassen. Als Antioxidans wurde 1 mg Deferoxamin-Mesylat zugegeben. Dann wurde der pH-Wert der Lösung durch

Zugabe von 1 Tropfen 10 mM HCl auf einen pH-Wert von ca. 7,24 eingestellt. Die Lösung ließ sich bei einer Wasserbadtemperatur von 35°C unter Rühren makroskopisch homogenisieren.

#### Vergleichsbeispiel D (Beispiel 4 aus EP-A 0 220 797)

##### Zusammensetzung

400 mg gereinigtes hydriertes Sojabohnen-Lecithin  
40 mg HCO-60 (Polyoxyethylen hydriertes Rhizinusöl)  
100 mg Vitamin E  
9,46 ml bidest. Wasser

Es wurden 400,04 mg Phospholipon 90 H (hydriertes Sojabohnenlecithin), 40 mg Eumulgin HRE 60 (Polyoxyethylenhydriertes Rhizinusöl) und 100,11 mg Vitamin E in ein 100 ml Becherglas eingewogen und mit 9,46 ml bidest. Wasser aufgefüllt. Die Probe wurde 45 Minuten, bis fast alles gelöst war, gerührt. Dann wurde die Lipidlösung für 10 Minuten bei 79°C im Ultraschallbad beschallt. Zur vollständigen Lösung wurde die Probe nochmals gerührt und für 10 Minuten bei 56°C im Ultraschallbad beschallt.

#### Vergleichsbeispiel E (Beispiel 2 aus EP-A 0 102 324)

##### Zusammensetzung

300 mg SPC  
150 mg Octadecyltrimethylammoniumbromid  
2550 µl dest. Wasser

Es wurden 300 mg SPC und 150 mg Octadecyltrimethylammoniumbromid in ein 100 ml Becherglas eingewogen und mit 1 ml Chloroform/Methanol 1 : 1 gelöst. Die Probe wurde im Vakuum bis zur Trocknung eingeengt. Durch Hinzugabe von dest. Wasser wurde eine 1%ige Lösung hergestellt. Die erhaltene Lösung wurde 15 Minuten gerührt.

Die Probenzubereitungen der Vergleichsbeispiele A—E wurden (wenn nicht anders angegeben) den jeweiligen Vorschriften in den genannten Druckschriften entsprechend durchgeführt.

In Fig. 8 ist in Form einer Balkengraphik die Permeationsfähigkeit (bei einem konstanten Druck von 0,9 MPa) für die Vergleichsbeispiele A—E und für ein erfindungsgemäßes Ibuprofen-/SPC-Transfersom aufgeführt. Aus der Balkengraphik (Fig. 8) geht deutlich hervor, daß die Zusammensetzungen der Vergleichsbeispiele A bis E bei höherem Druck (0,9 MPa) im Vergleich zu erfindungsgemäßen Transfersomen eine signifikant geringere Permeationsfähigkeit aufweisen.

##### Patentansprüche

1. Präparate zur Applikation bzw. zum Transport von wenigstens einem Wirkstoff, insbesondere für medizinische oder biologische Zwecke, in und durch Barrieren und Konstrictionen wie Häute und dergleichen, in Form von in einem flüssigen Medium suspendierbaren Flüssigkeitströpfchen, die mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Trägersubstanz versehen sind, wobei die Trägersubstanz wenigstens zwei (physiko)-chemisch verschiedene Komponenten umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Komponenten vorgesehen sind, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium der Präparate, üblicherweise Wasser, um einen Faktor von mindestens 10 unterscheiden, und der Gehalt solubilisierender Komponenten weniger als 0,1 Mol-%, bezogen auf den Gehalt an diesen Substanzen, beträgt, bei dem der Solubilisierungspunkt der umhüllten Tröpfchen erreicht wird oder aber dieser Solubilisierungspunkt nicht erreicht werden kann.
2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphilen Komponenten so ausgewählt sind, daß konzentrationsunabhängig keine Solubilisierung erfolgt.
3. Präparat nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Löslichkeit, insbesondere die Wasserlöslichkeit der löslicheren Komponente(n) mindestens  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  M und die Löslichkeit, insbesondere die Wasserlöslichkeit der weniger löslichen Komponente(n) mindestens  $10^{-6}$  bis  $10^{-10}$  M beträgt.
4. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Löslichkeitsunterschied der löslicheren Komponente(n) und der weniger löslichen Komponente(n) ungefähr zwischen  $10^2$  und  $10^7$ , vorzugsweise zwischen  $10^2$  und  $10^6$  und besonders bevorzugt zwischen  $10^3$  und  $10^5$  beträgt.
5. Präparat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Fähigkeit des Präparates, durch Konstrictionen zu permeieren, mindestens 0,01 Promille, vorzugsweise 1 Promille, der Permeabilität von kleinen, im wesentlichen ungehindert permeierenden Molekülen beträgt.
6. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis der Permeationsfähigkeit gegenüber Referenzteilchen  $P_{\text{transy}}/P_{\text{Refer}}$ , wobei die Referenzteilchen, beispielsweise Wasser, viel kleiner sind als die Konstrictionen in der Barriere, wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, zwischen  $10^{-5}$  und 1, vorzugsweise zwischen  $10^{-4}$  und 1 und besonders bevorzugt zwischen  $10^{-2}$  und 1 liegt.
7. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat einen Gehalt von

mindestens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Löslichkeit, zur Bildung einer Trägersubstanz und/oder einer membranartigen Hülle um eine Tröpfchenmenge hydrophiler Flüssigkeit umfaßt, worin der Wirkstoff in der Trägersubstanz, in oder an der membranartigen Hülle und/oder in der hydrophilen Flüssigkeit enthalten ist.

8. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Vesikelradius der umhüllten Tröpfchen zwischen ungefähr 25 und ungefähr 500 nm, vorzugsweise zwischen ungefähr 50 und ungefähr 200 nm, besonders bevorzugt zwischen ungefähr 80 und ungefähr 180 nm liegt.

9. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Umhüllung eine Doppelschicht ist.

10. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Komponente(n) physiologisch verträgliche Lipide unterschiedlicher Polarität und/oder solche Wirkstoff(e) umfaßt.

11. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz ein Lipid oder Lipoid biologischer Herkunft oder ein entsprechendes synthetisches Lipid bzw. ein Derivat solcher Lipide ist, insbesondere Diacyl- oder Dialkyl-glycerophosphoethanolaminazopolyethoxylen-derivat, Didecanoylphosphatidylcholin, Diacylphosphooligomaltobionamid, ein Glycerid, Glycerophospholipid, Isoprenoildlipid, Sphingolipid, Steroid, Sterin oder Sterol, ein schwefel- oder kohlenhydrathaltiges Lipid, oder aber ein anderes Lipid, das stabile Strukturen, z. B. Doppelschichten bildet, vorzugsweise eine halb protonierte fluide Fettsäure, insbesondere ein Phosphatidylcholin, Phosphatidyethanolamin, Phosphatidylprotonierte fluide Fettsäure, insbesondere eine Phosphatidsäure, ein Phosphatidylserin, ein Sphingomyelin oder Sphingoglycerol, Phosphatidylinositol, eine Phosphatidsäure, ein Phosphatidylserin, ein Sphingomyelin oder Sphingoglycerol, Phosphatidylcholin (z. B. Cerebrosid, Ceramidpolyhexosid, Sulfatid, Sphingoglycosamin), gophospholipid, Glykosphingolipid (z. B. Cerebrosid, Ceramidpolyhexosid, Sulfatid, Sphingoglycosamin), Gangliosid oder anderes Glykolipid umfaßt, oder ein synthetisches Lipid, vorzugsweise ein Dioleoyl-, Digangliosid oder anderes Glykolipid umfaßt, oder ein synthetisches Lipid, vorzugsweise ein Dioleoyl-, Dilinolyl-, Dilinolenyl-, Dilinoleoyl-, Dinolinolyl-, Diarachinoyl-, Dilauroyl, Dimyristoyl-, Dilalmitoyl-, Distearoylphospholipid oder ein entsprechendes Dialkyl- bzw. Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes gleich- oder gemischtkettiges Acyl- bzw. Alkyl-Lipid umfaßt.

12. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die weniger lösliche amphiphile Komponente ein synthetisches Lipid, vorzugsweise Myristoleoyl-, Palmitoleoyl-, Petroselinyl-, Petroselinoyl-, Oleoyl-, Elaidyl-, cis- bzw. trans-Vaccenoyl-, Linolyl-, Linolenyl-, Linolaidyl-, Octadecatetraenoyl-, seldaidyl-, Eicoenoyl-, Eicosadienoyl-, Eicosatrienoyl-, Arachidoyl-, cis- bzw. trans-Docosaeoyl-, Docosa-Gondoyl-, Eicoeaoenoyl-, Eicosadienoyl-, Eicosatrienoyl-, Arachidoyl-, Myristoyl-, Pentadecanoyl-, die-noyl-, Docosatrienoyl-, Docosatetraenoyl-, Caproyl-, Lauroyl-, Tridecanoyl-, glycerophospholipid bzw. ein entsprechend Palmitoyl-, Heptadecanoyl-, Stearoyl- bzw. Nonadecanoyl-, glycerophospholipid oder anderes Acyl- bzw. ketten-verzweigtes Derivat oder ein entsprechendes Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes Acyl- bzw. Alkyl-Lipid umfaßt; und die besser lösliche amphiphile Komponente(n) von einer der oben aufgeführten, weniger löslichen Komponente abgeleitet ist und zur Erhöhung der Löslichkeit mit einem Butanoyl-, Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl-, Octanoyl-, Nonanoyl-, Decanoyl-, Dodecanoyl- oder Undecanoyl- oder einem entsprechend einfach oder mehrfach ungesättigten bzw. kettenverzweigten Substituenten davon anderen zur Verbesserung der Löslichkeit geeigneten Stoff substituiert, komplexiert und/oder assoziiert ist.

13. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz zur Applikation auf menschlicher und tierischer Haut zwischen 0,01 und 40 Gew.-% des Präparates, vorzugsweise zwischen 0,1 und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 und 10 Gew.-% beträgt.

14. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Gesamtgehalt an amphiphiler Substanz zur Applikation bei Pflanzen 0,000001 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise zwischen 0,001 und 1 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-% beträgt.

amplifiziert und besonders bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-% beträgt  
und 1 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,01 und 0,1 Gew.-% betragt,  
15. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff ein Adreno-  
cortistaticum, β-Adrenolyticum, Androgen oder Antiandrogen, Antiparasiticum, Anabolicum, Anästheti-  
cum oder Analgesicum, Analepticum, Antiallergicum, Antiarrhythmicum, Antiarterioscleroticum, Anti-  
asthmaticum und/oder Bronchospasmodyticum, Antibioticum, Antidepressivum und/oder Antipsychoticum,  
Antidiabeticum, Antidotum, Antiemeticum, Antiepileptikum, Antifibrinolyticum, Anticonvulsivum, Anticho-  
linergicum, Enzym, Koenzym oder ein entsprechender Inhibitor, ein Antihistaminicum, Antihypertonicum,  
einen biologischen Aktivitätsinhibitor, ein Antihypotonicum, Antikoagulans, Antimycoticum, Antimyastehe-  
nicum, einen Wirkstoff gegen morbus Parkinson oder Alzheimer, ein Anthroplogisticum, Antipyreticun,  
Antirheumaticum, Antisepticum, Atemanalepticum oder Atemstimulanz, Broncholyticum, Cardiotonicum,  
Chemotherapeuticum, einen Coronardilatator, ein Cytostaticum, Diureticum, einen Ganglienblocker, ein  
Glucocorticoid, Grippetherapeuticum, Hämostaticum, Hypnoticum, Immunglobulin bzw. -fragment oder  
eine andere immunologische bzw. Rezeptor-Substanz, ein bioaktives Kohlehydrat(derivat), ein Kontrazepe-  
neurotransmitter oder entsprechenden Antagonisten, ein Peptid(derivat), ein Ophthalmicum, (Para)-Sympa-  
lyticum, Tuberlostolicum, Urologicum, einen Vasoconstrictor oder -dilatator, ein Virusstaticum oder ein  
Wundenheilmittel oder mehrere solcher Agentien, insbesondere Diclofenac bzw. Ibuprofen, enthält.

... durch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein nichtsteroi-

lyticum, Tuberostaticum, Orogel, etc.) und/oder als Wundheilmittel oder mehrere solcher Agentien, insbesondere Diclofenac bzw. Ibuprofen, Ethyl-  
16. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein nichtsteroi-  
dales Antiinflammatoricum, beispielsweise Diclofenac, Ibuprofen oder ein Lithium-, Natrium-, Kalium-,  
Cäsium-, Rubidium-, Ammonium-, Monomethyl-, Dimethyl-, Trimethylammonium- oder Ethylammonium-  
Salz davon ist.

Salz davon ist.

17. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die weniger polare Kompo-



- nente ein physiologisch verträgliches Lipid, bevorzugt aus der Klasse der Phospholipide, besonders bevorzugt aus der Klasse der Phosphatidylcholine, umfaßt und der Wirkstoff die löslichere Komponente ist, gegebenenfalls mit einem Zusatz von weniger als 10 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung des Präparates einer weiteren löslichen Komponente, die löslichere Komponente ist, wobei die Konzentration der löslicheren Komponente(n) typischerweise zwischen 0,01 Gew.-% und 15 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,1 Gew.-% und 10 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 3 Gew.-%, und die Gesamtlipidkonzentration zwischen 0,005 Gew.-% und 40 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 15 Gew.-% und besonders bevorzugt zwischen 1 Gew.-% und 10 Gew.-% beträgt.
18. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat Konsistenzbildner, wie Hydrogele, Antioxidantien wie Probuco, Tocopherol, BHT, Ascorbinsäure, Desferroxamin und/oder Stabilisatoren wie Phenol, Cresol, Benzylalkohol und dergleichen umfaßt.
19. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine wachstumsbeeinflussende Substanz für Lebewesen ist.
20. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff biozide Eigenschaften hat, insbesondere ein Insektizid, Pestizid, Herbizid oder Fungizid ist.
21. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Lockstoff, insbesondere ein Pheromon ist.
22. Verfahren zur Herstellung eines Präparates, zur Applikation bzw. Transport von wenigstens einem Wirkstoff, insbesondere für medizinische oder biologische Zwecke, in und durch natürlich Barrieren und Konstriktionen wie Häute und dergleichen in Form von in einem flüssigen Medium suspendierbaren Flüssigkeitströpfchen, die mit einer membranartigen Hülle aus einer oder wenigen Lagen amphiphiler Trägersubstanz versehen sind, wobei die Trägersubstanz wenigstens zwei (physiko)chemisch verschiedene Komponenten umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei amphiphile Komponenten ausgewählt werden, die sich in ihrer Löslichkeit im Suspensionsmedium des Präparats, üblicherweise Wasser, um einen Faktor von mindestens 10 unterscheiden, und der Gehalt solubilisierender Komponenten weniger als 0,1 Mol.-%, bezogen auf den Gehalt an diesen Substanzen, beträgt, bei dem der Solubilisierungspunkt der umhüllten Tröpfchen erreicht wird, oder aber dieser Punkt im praktisch relevanten Bereich nicht erreicht werden kann, und der Gehalt an amphiphilen Komponenten so eingestellt wird, daß die Fähigkeit des Präparates durch Konstriktionen zu permeieren mindestens 0,01 Tausendstel der Permeabilität von kleinen Molekülen, beispielsweise Wasser, beträgt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt der amphiphilen Komponenten so eingestellt wird, daß das Verhältnis der Permeationsfähigkeit gegenüber Referenzteilchen, welche viel kleiner sind als die Konstriktionen in der Barriere, beispielsweise Wasser, wenn die Barriere selbst der Bestimmungsort ist, zwischen  $10^{-5}$  und 1, vorzugsweise zwischen  $10^{-4}$  und 1, besonders bevorzugt zwischen  $10^{-2}$  und 1 beträgt.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 und 23, dadurch gekennzeichnet, daß man Stabilität und Permeationsfähigkeit mittels Filtration, ggf. unter Druck, durch ein feinporiges Filter oder durch anderweitige kontrollierte mechanische Aufwirbelung, Scherung oder Zerkleinerung bestimmt.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Substanzgemisch, zur Erzeugung eines transfersomenartigen Präparats, einer Filtration, Ultraschallbehandlung, Rühren, Schütteln oder anderen mechanischen Zerteilungseinwirkungen ausgesetzt wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man aus wenigstens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Polarität, wenigstens einer polaren Flüssigkeit und wenigstens einem Wirkstoff transfersomenartige Tröpfchen erzeugt, die das Präparat bilden.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man aus wenigstens zwei amphiphilen Komponenten unterschiedlicher Polarität und wenigstens einer polaren Flüssigkeit transfersomenartige Tröpfchen erzeugt, die das Präparat bilden, worin die amphiphile Komponente(n) den Wirkstoff umfaßt oder beinhaltet.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man separat jeweils die amphiphilen Komponenten und die hydrophile Substanz mit dem Wirkstoff vermischt und ggf. zur Lösung bringt, die Gemische bzw. Lösungen dann zu einer Mischung zusammenführt und in dieser durch Zufuhr von insbesondere mechanischer Energie die Tröpfchenbildung bewirkt.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphilen Komponenten entweder als solche oder gelöst in einem physiologisch verträglichem, mit polarer Flüssigkeit(en), insbesondere Wasser mischbaren Lösungsmittel oder Lösungsvermittler mit einer polaren Lösung zusammengegeben werden.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der umhüllten Tröpfchen durch Einrühren, mittels Verdampfung aus einer Umkehrphase, durch ein Injektions- oder Dialyseverfahren, durch elektrische, thermische oder mechanische Beanspruchung wie Schütteln, Rühren, Homogenisieren, Ultraschall, Reiben, Frieren bzw. Auftauen, Heizen oder Kühlen oder Hoch- oder Niederdruck-Filtration herbeigeführt wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der umhüllten Tröpfchen durch Filtration bewirkt wird und das Filtermaterial eine Porengröße von 0,01 bis 0,8  $\mu\text{m}$ , insbesondere 0,05 bis 0,3  $\mu\text{m}$  und besonders bevorzugt 0,08 bis 0,15  $\mu\text{m}$  aufweist, wobei ggf. mehrere Filter hintereinander geschaltet verwendet werden.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Träger-Wirkstoffassoziation wenigstens teilweise nach der Tröpfchenbildung erfolgt.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die umhüllten Tröpfchen

DE 44 47 287 C1

kurz vor der Anwendung aus einem Konzentrat oder Lyophilisat zubereitet werden.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

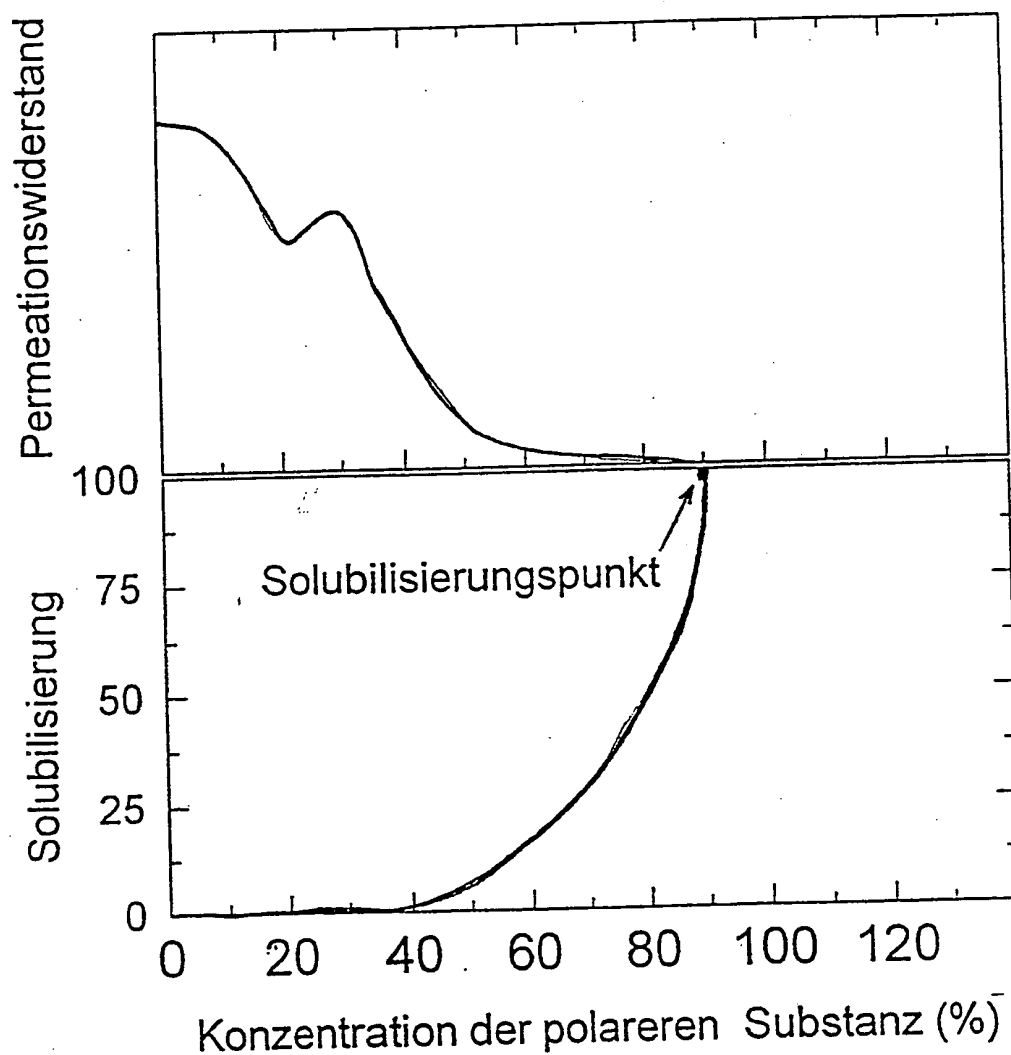
50

55

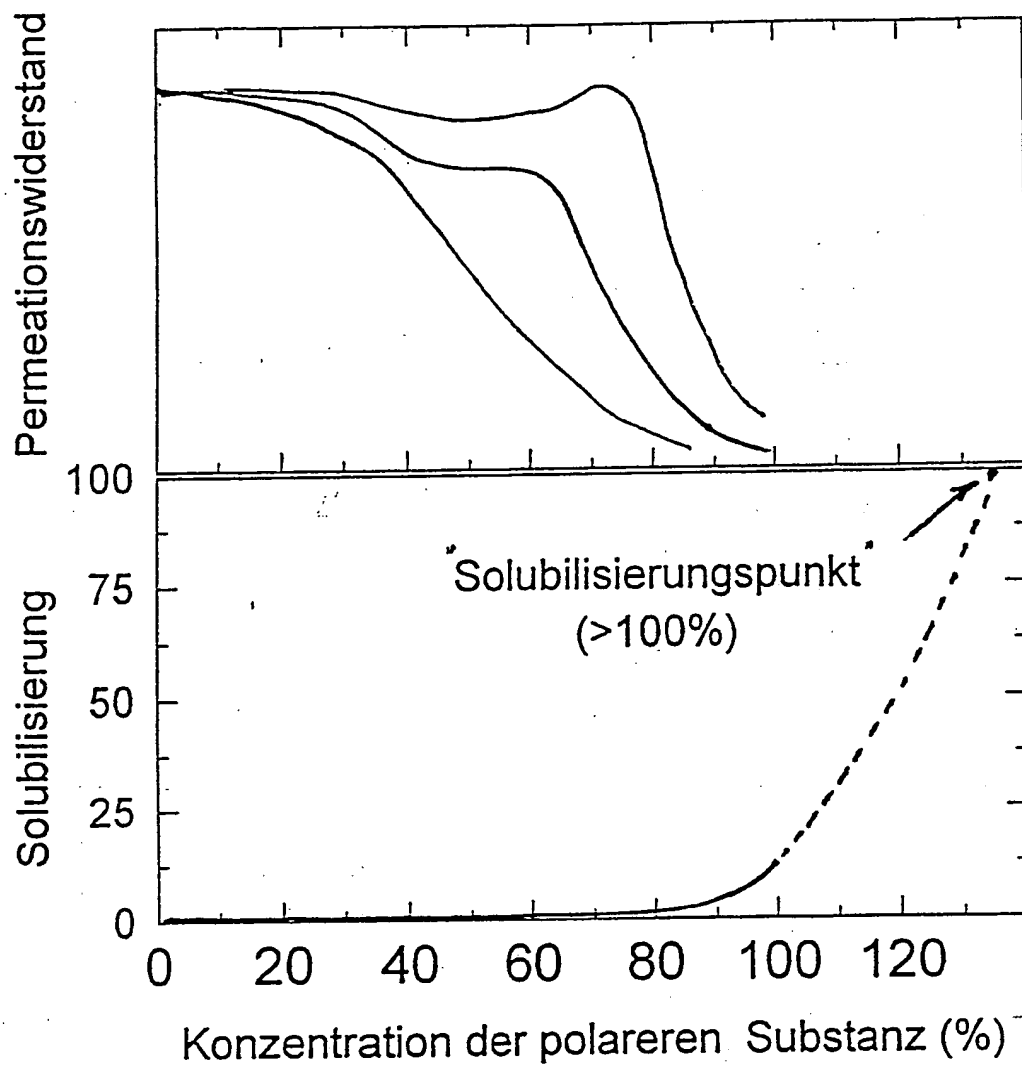
60

65

- Leerseite -

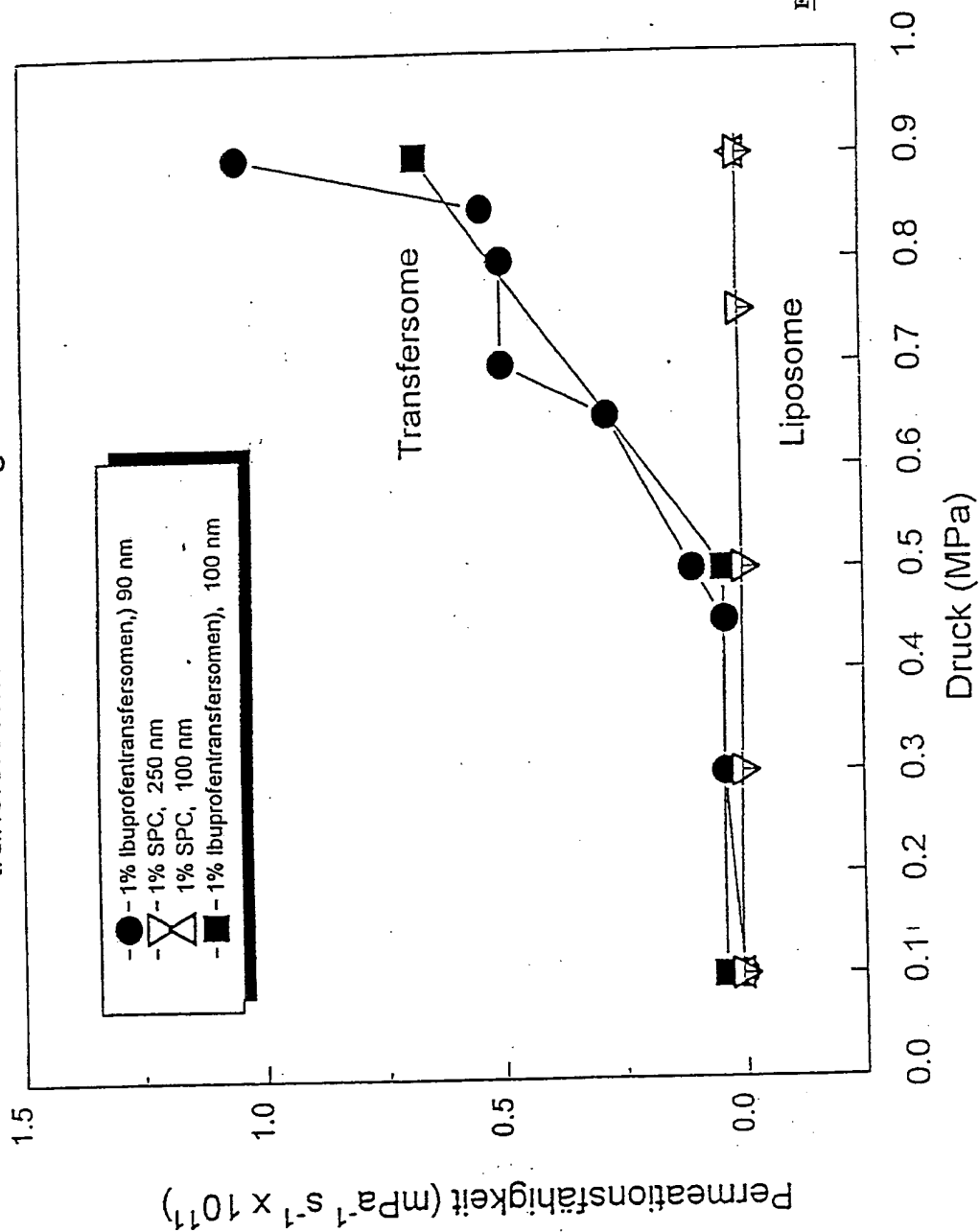


**FIGUR 1**

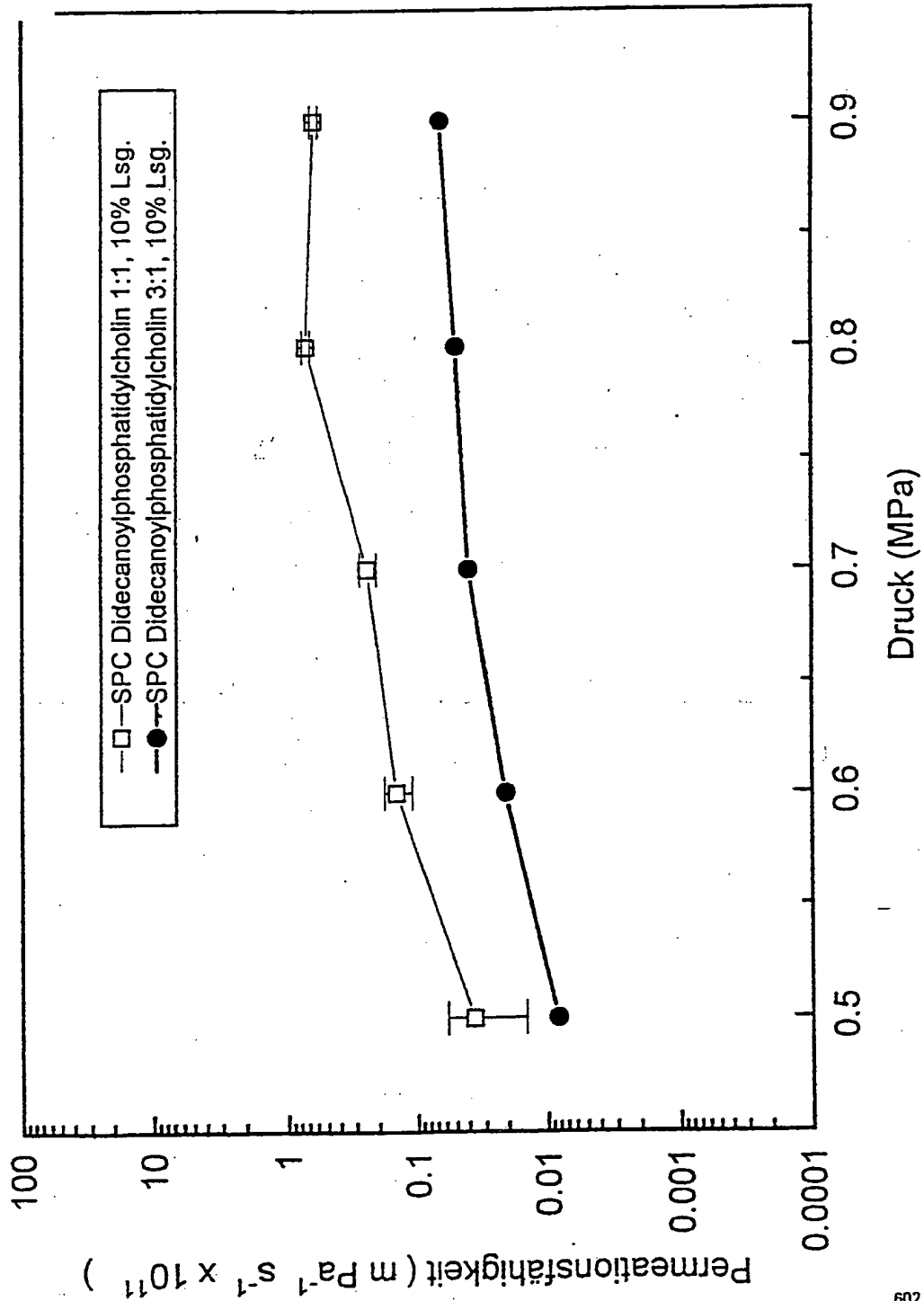


FIGUR 2

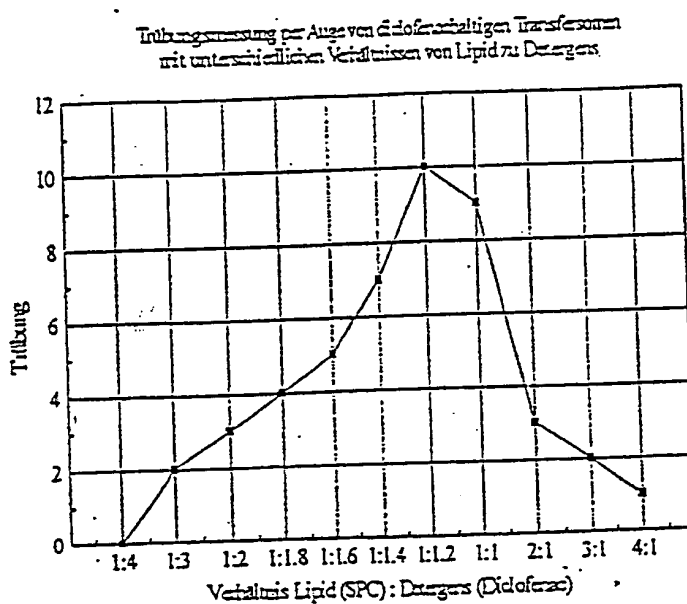
Permeationsmessungen mit 1%-igen Ibuprofen-  
 transfersomen und 1%-igen SPC



FIGUR 3

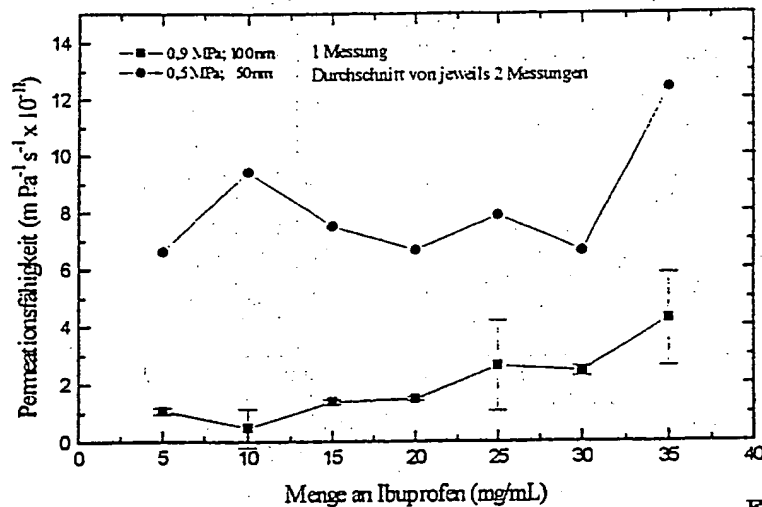


FIGUR 4



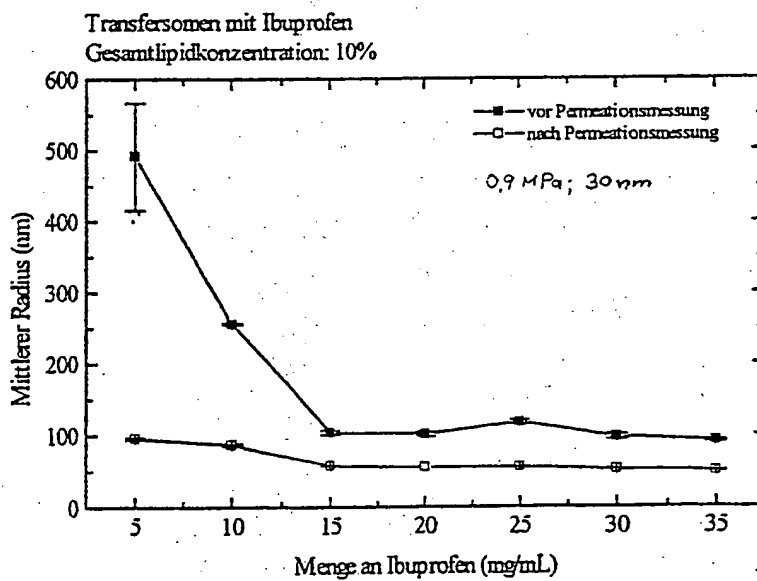
**FIGUR 5**



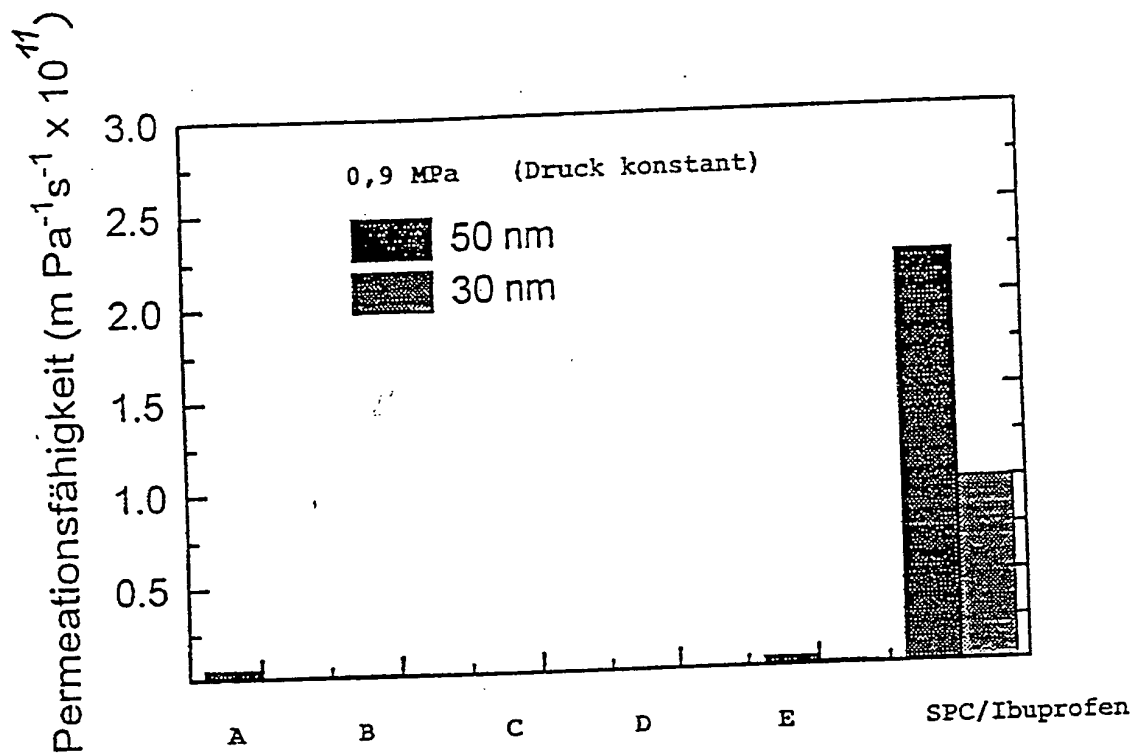


FIGUR 6

Die Teilchengröße wird durch dynamische Lichtstreuung bestimmt



FIGUR 7



FIGUR 8



(21) (A1) **2,238,263**  
(86) 1996/12/09  
(87) 1997/06/19

- (72) WEDER, Hans Georg, CH  
(72) WEDER, Marc Antoine, CH  
(71) VESIFACT AG, CH  
(51) Int.Cl.<sup>6</sup> A61K 31/57, A61K 9/12, A61K 9/107  
(30) 1995/12/12 (3499/95) CH  
(54) **PULVERISATEUR D'HYDROCORTISONE POUR  
ADMINISTRATION TOPIQUE**  
(54) **CORTISONE SPRAY FOR TOPICAL ADMINISTRATION**

(57) L'invention concerne une préparation pharmaceutique d'application dermique d'hydrocortisone. Ce principe actif est dispersé par adjonction d'un ester d'acide gras partiel de sorbitanne de polyéthylène et d'autres auxiliaires tels que la lécithine et l'huile neutre. Ce système permet d'obtenir une suspension de particules de l'ordre du nanomètre du principe actif hydrocortisone lipophile.

(57) The present invention relates to a pharmaceutical mixture for the dermal application of hydrocortisone. The active agent is dispersed with the addition of a partial fatty acid ester of polyoxyethylene sorbitan and other auxiliaries like lecithin and neutral oil. This provides a suspension of nanoparticles of the lipophilic agent hydrocortisone.



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 1 -

Cortisol Spray

5           The present invention relates to a pharmaceutical composition for the dermal application of hydrocortisone or a derivative thereof, a method for manufacture of this pharmaceutical composition as well as its application in therapy.

10           The body specific glucocorticoid hormone (cortisol), *Merck Index Eleventh Edition (1989) No. 4710, page 4711*, chemical description: 11, 17, 21-trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion, is dermally administered as an anti-inflammatory agent for treating inflammatory diseases,  
15           e.g. eczemas, psoriasis, dermatitis, contact allergies etc. The *Index Nominum 1992/93, Swiss Pharmaceutical Society, Medpharm, Scientific Publ. D-Stuttgart* lists for the active ingredient hydrocortisone 81 dermal preparations with registered trademarks. Of the derivatives, in  
20           particular the 21-acetate there are likewise known numerous preparations.

          Since the mentioned inflammatory skin diseases can be resistant and protracted, a dermal preparation  
25           should be suitable for administering over a longer period of time. With the prolonged application of glucocorticoids on the skin in spite of a good effectiveness and provable healing successes, systemic effects and side effects are

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 2 -

problematic, for this see section G10 in Rote Liste 1994,  
Arzneimittelverzeichnis des BPI (Bundesverband der Pharma-  
zeutischen Industrie), ECV Editio Cantor, D-88322 Aulen-  
dorf, No. 64009. Numerous dermal preparations therefore,  
5 instead of one of the highly effective new active ingredi-  
ents of the glucocorticoid type described numerously in  
the literature, contain only the more weakly effective  
hydrocortisone which has been known for a long time and  
this even further in an extremely small dosage, e.g. most-  
10 ly 1 mg per gram of formulation. One has therefore  
attempted to improve the lower effectiveness of such prep-  
arations by increasing the dosage. Preparations with a  
higher dosage even of hydrocortisone must however due to  
the known side effects and the numerous counter indi-  
15 cations be subjected to medical control and mandatory pre-  
scription.

It is therefore the object of the invention to  
manufacture for the well-tried active ingredient  
20 hydrocortisone a dermal preparation with an improved  
effectiveness with a smaller dosage.  
In the narrower sense, it is the object of the present  
invention to manufacture for the active ingredient  
hydrocortisone an improved dermal preparation which is  
25 suitable for releasing without prescription as a so-called  
OTC preparation (Over-the Counter preparation) within the  
framework of the so-called self-medication.

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



The achievement of the object is based on the consideration that by increasing the solubility of the active ingredient hydrocortisone in the formulation base, an improvement in effectiveness with an unchanged low concentration is to be achieved. Hydrocortisone itself is weakly soluble in water which in dermal formulations is a considerable constituent. The *Merck Index*, loc, cit., indicates a water solubility of 0.28 mg/ml (25°C). In ethanol the active ingredient is more soluble: 15 mg/ml (25°C).

10 The addition of large quantities of ethanol for improving the solubility of the active ingredient is not suitable for dermal preparation, since ethanol for other constituents of the formulation likewise acts as a solvent and encourages the drying of the skin. Alternatively to the

15 application of an unsuitable solvent numerous publications suggest aqueous finely dispersed systems with dissolving properties based on lipid mixtures. Herein the insoluble active ingredient is enclosed in lipid particles with a particle size of less than 1  $\mu\text{m}$ , which with the aqueous

20 carrier fluid form a colloid-dispersed or finely dispersed system, which although does not represent an true molecular dispersed solution, is however sufficiently homogeneous for a dermal formulation. In the literature on the subject there is mentioned the encapsulation of lipophils

25 and/or weakly soluble active ingredients in micelles, mixed micelles, reverse micelles, unilamellar or multilamellar liposomes, nanocapsules, nanoparticles etc.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 3a -

The document DE-A-4018995 describes the incorporation of  
5 corticosteroids into an amphiphillic, non-ionic lipid  
phase, which in an aqueous phase forms vesicles with a  
size of 10 to 5000 nm. The document WO-A-93/18752  
describes compositions for the dermal application of phar-  
maceutical products with particles from an oily fluid,  
10 from an emulsifying agent, e.g. a phospholipid, and from a  
non-ionic tenside. The particles have a size of 50 to 500  
nm which in the examples in the document are achieved by  
treatment in a homogeniser. For the oily fluid as well as  
for the emulsifying agent and the tenside in each case  
15 there are mentioned numerous possible substances in the  
document.

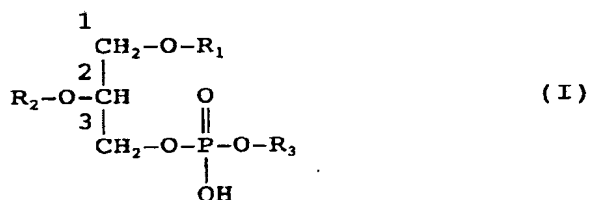
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

It has been surprisingly found out that a lipophile formulation base consisting of partial fatty acid ester of polyoxyethylene sorbitan, of a phospholipid and of a neutral oil is suitable for manufacturing a particularly homogeneous finely dispersed nanodispersion of the active ingredient hydrocortisone. The present invention has as the subject-matter a pharmaceutical composition for the dermal application of a corticoid, which has the following constituents:

a) the active ingredient 11, 17, 21 -trihydroxypregn-4-en-3,20-dion (hydrocortisone) or a derivative thereof, where appropriate in combination with a wound healing agent;

b) at least one partial fatty acid ester of polyoxyethylene sorbitan or a combination thereof;

c) at least one essentially pure phospholipid of the formula:



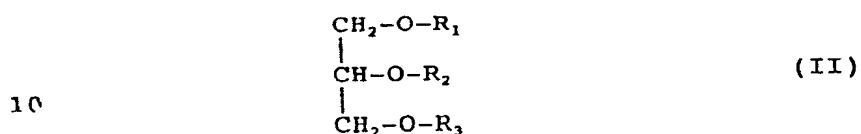
where  $R_1$  indicates  $C_{10-20}$ -acyl,  $R_2$  hydrogen or  $C_{10-20}$ -acyl,  $R_3$  hydrogen, 2-trimethylamino-1-ethyl, 2-amino-1-ethyl,  $C_{1-4}$ -alkyl,  $C_{1-5}$ -alkyl substituted by carboxy,  $C_{2-5}$ -alkyl substi-

THIS PAGE IS BLANK (EXCEPT)

- 5 -

tuted by hydroxy, C<sub>2-5</sub>-alkyl substituted by carboxy and hydroxy or C<sub>2-5</sub>-alkyl substituted by carboxy and amino, the inositol or glyceryl group, or salts of these compounds;

5 d) a triglyceride of the formula:



where R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> indicates C<sub>8-24</sub>-acyl;

15 e) water as a carrier fluid in the purity required for the transdermal application; and where appropriate

f) aiding agents suitable for dermal forms of administration.

20

This pharmaceutical composition is distinguished by favourable phase properties of the solubilised active ingredient. Thus with a present opalescence and transparency in counter light it is only to be recognised by an extremely slight milky murkiness that the suspension still has physical differences with respect to the ideal condition of a pure molecular solution. Electron microscope imaging shows that a population of more than 98% of the active ingredient is present in a Gaussian distribution as a dispersion of particles (nanoparticles) with a particle size of less than approx. 50 nm (nanodispersion).

25

30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



- 6 -

These differences with respect to a pure solution are however acceptable on account of the particularly good homogeneity properties of the dispersion, which for example can be detected by a surprisingly high storage stability, e.g. no segregation after a storage lasting several months at temperatures of up to room temperature (the stability to be expected by extrapolation is longer than two years). All these properties may be achieved without the additional application of a homogeniser by way of a simple mixing of the constituents.

A preferred embodiment form concerns a pharmaceutical composition containing:

- a) the active ingredient hydrocortisone or the 21-acetate, where appropriate in combination with dexpanthenol;
- b) the composition consisting of polysorbate 20, 80 and 60;
- c) purified lecithin from soya beans;
- d) a triglyceride from the group of neutral oils; and
- e) water as a carrier fluid in the purity required for the dermal application; and where appropriate
- f) aiding agents suitable for dermal forms of administration.

25

The active ingredient hydrocortisone - component a) - in the pharmaceutical composition described nearer the beginning is contained in the dosage allowable

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 6a -

5 for the dermal application. In the commercial formulation  
according to the *Rote Liste* or *Arzneimittelkompendium der*  
*Schweiz, Documed Basel, Schweiz*, in prescription-free pre-

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 7 -

parations there is contained a dose of approx. 0.1 to 0.5% (calculated with respect to free hydrocortisone).

A derivative of hydrocortisone is in particular  
5 the 21-acetate, 21-acetate-17-propionate (aceponate), 21-bendazac, 17 $\alpha$ -butyrate, 17 $\alpha$ -butyrate-21-propionate, 21-cipionate (cyclopentane propionate), 21-disodium phosphate, 21-hydrogen succinate, 21-sodium succinate, 21-tebutate (tert. butyl acetate), 17-valerate or xanthogen-  
10 ate.

The active ingredient hydrocortisone or one of the mentioned derivatives may in the pharmaceutical composition be contained in combination with a known wound  
15 treating agent or epithilisation agent, e.g. dexpanthenol.

The component b) - partial fatty acid ester of polyoxyethylene sorbitan - consists preferably of an essentially pure or mixture of various esters of sorbitan,  
20 wherein the structure of the fatty acid groups and the length of the polyoxyethylene chains vary. The sorbitan is preferably ethered by three hydrophillic polyoxyethylene chains and esterated by a hydrophobic fatty acid group. The sorbitan may however also be ethered only by one or two  
25 hydrophillic polyoxyethylene chains and accordingly esterated by three or two hydrophobic fatty acid groups. In total the sorbitan base body is substituted by at least one to at most three hydrophillic polyoxyethylene groups

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

and accordingly by at most three and at least one hydrophobic fatty acid group.

The polyoxyethylene chain is straight-chained and comprises preferably 4-10, in particular 4-8, ethylene oxide units. The ester groups on the sorbitan base body are derived from a saturated or unsaturated, straight-chained carbon acid and an even number of 8-10 C-atoms. The ester group derived from this carbon acid is preferably straight chained with 12, 14, 16 and 18 C-atoms, e.g. n-dodecanoyl, n-tetradecanoyl, n-hexadecanoyl or n-octadecanoyl. The ester group derived from an unsaturated carbon acid with an even number of 8-20 C-atoms is preferably straight-chained with 12, 14, 16 and 18 C-atoms, e.g. oleoyl. The mentioned esters of sorbitan, fulfil the details mentioned in the British Pharmacy list (special monograph) or Ph. Helv. VII. There applies in particular the product descriptions published by the mentioned manufacturers with the details of data sheets for the product concerned, in particular specifications such as form, colour, HLB-value, viscosity, rising melting point and solubility.

Suitable partial fatty acid esters of polyoxyethylene sorbitan are commercially obtainable under the name Tween® of the company ICI and known under the chemical description polyoxyethylene (20 or 4)-sorbitan mono-laurate (TWEEN 20 and 21), polyoxyethylene-(20)-sorbitan

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



- 9 -

monopalmitate or monostearate (TWEEN 40 and 60), polyoxy-  
ethylene-(4 or 20)-sorbitan-monostearate or tristearate  
(TWEEN 61 and 65), polyoxyethylene- (20 or 5)-sorbitan  
monooleate (TWEEN 80 or 81) or polyoxyethylene-(20)-  
5 sorbitan trioleate (TWEEN 85).

In a particularly preferred embodiment form of  
the invention one uses as component b) a combination con-  
sisting of TWEEN 20, TWEEN 80 and TWEEN 60, or polysorbate  
10 20, 80 and 60.

The component b) is contained in the pharma-  
ceutical composition in a quantity part of approx. 1.0% to  
5.0%, preferably 1.0% to 3.0% (with respect to the total  
15 weight of  
the formulation).

Component c) phospholipid of the formula I. The  
nomenclature of the phospholipid (I) and the numbering of  
20 the C-atoms is effected by way of the recommendations (sn-  
nomenclature, stereospecific numbering) cited in the Eur.  
J. of Biochem. 79, 11-21 (1977) of the IUPAC-IUB Commis-  
sion on Biochemical Nomenclature (CBN).

25  $R_1$  and  $R_2$  with the meanings  $C_{10-20}$ -acyl are pre-  
ferably straight chained  $C_{10-20}$ -alkanoyl with an even number  
of C-atoms and straight-chained  $C_{10-20}$  alkenoyl with a  
double bonding and an even number of C-atoms.



- 10 -

Straight chained  $C_{10-20}$  alkanoyl  $R_1$  and  $R_2$  with an even number of C-atoms are for example n-dodecanoyl, n-tetradecanoyl, n-hexadecanoyl or n-octadecanoyl.

5                   Straight chained  $C_{10-20}$  alkanoyl  $R_1$  and  $R_2$  with a double bonding and an even number of C-atoms are for example 6-cis- or 6-trans-, 9-cis- or 9-trans-dodecenoyl, -tetradecenoyl, -hexadecenoyl, -octadecenoyl or -icosenoyl, in particular 9-cis-octadecenoyl (oleoyl),  
10 further 9,12-cis-octadecadienoyl or 9, 12, 15-cis-octadecatrienoyl.

A phospholipid (I), wherein  $R_3$  indicates 2-trimethylamino-1-ethyl is described with the trivial name  
15 lecithin and a phospholipid (I), wherein  $R_3$  indicates 2-amino-1-ethyl is described with the trivial name kephalin. Suitable for example are naturally occurring kephalin or lecithin, e.g. kephalin or lecithin from soya beans or chicken eggs with various or identical acyl groups  $R_1$  and  
20  $R_2$ , or mixtures thereof.

The phospholipid (I) may however also have a synthetic origin. Under the term synthetic phospholipid one defines phospholipids which with respect to  $R_1$  and  $R_2$   
25 have a unitary composition. Such synthetic phospholipids are preferably the lecithins and kephalins defined previously, whose acyl groups  $R_1$  and  $R_2$  have a defined structure and are derived from a defined fatty acid with a

THIS PAGE BLANK (USED)

- 11 -

degree of purity of more than approx. 95%.  $R_1$  and  $R_2$  may be the same or different and unsaturated or saturated. Preferably  $R_1$  is saturated, e.g. n-hexadecanoyl, and  $R_2$  unsaturated, e.g. 9-cis-octadecenoyl (oleoyl).

5

The term "naturally occurring" phospholipid (I) defines phospholipids which with respect to  $R_1$  and  $R_2$  do not have a unitary composition. Such natural phospholipids are likewise lecithins and kephalins whose acyl groups  $R_1$  and  $R_2$  are structurally undefinable and are derived from naturally occurring fatty acid mixtures.

10

The requirement "essentially pure" phospholipid (I) defines a degree of purity of more than 90% (weight), preferably more than 95%, of the phospholipid (I), which can be proven by way of suitable methods of determination, e.g. paper chromatographically, with thin film chromatography, with HPLC or enzymatic colour test.

15

In a phospholipid (I)  $R_3$  has the meaning  $C_{1-4}$  alkyl for example methyl or ethyl. The meaning methyl is preferred.

20

$R_3$  with the meanings  $C_{1-5}$ -alkyl substituted by carboxy,  $C_{2-5}$ -alkyl substituted by hydroxy or  $C_{2-5}$ -alkyl substituted by carboxy or hydroxy are for example 2-hydroxyethyl, 2,3-dihydroxy-n-propyl, carboxymethyl, 1- or

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 12 -

2-carboxyethyl, dicarboxy-methyl, 2-carboxy-2-hydroxyethyl or 3-carboxy-2,3-dihydroxy-n-propyl.

5                   R<sub>3</sub> with the meaning C<sub>2-5</sub>-alkyl substituted by carboxy and amino is e.g. 3-amino-3-carboxy-n-propyl or 2-amino-2-carboxy-n-propyl, preferably 2-amino-2-carboxy-ethyl. Phospholipids (I) with these groups may be present in salt form, e.g. as sodium or potassium salt.

10                   Phospholipids (I), wherein R<sub>3</sub> indicates the inositol or glyceryl group, are known under the descriptions phosphate idylinositol and polyphosphate idylglycerol.

15                   For the acyl residuals in the phospholipids (I) as well as in the triglycerides (II) the descriptions indicated in brackets are usual:

20                   9-cis-dodecenol (lauroleoyl), 9-cis-tetradecenoyl (myristoleoyl), 9-cis-hexadecenoyl (palmitoleoyl), 6-cis-octadecenoyl (petroseloyl), 6-trans-octadecenoyl (petroselaidoyl), 9-cis-octadecenoyl (oleoyl), 9-trans-octadecenoyl (elaidoyl), 9, 12-cis-octadecadienoyl (linoleoyl), 9,12,15-cis-octadecatrienoyl (linolenoyl),  
25                   11-cis-octadecenoyl (vaccenoyl), 9-cis-icosenoyl (gadoleoyl), 5,8,11,14-cis-eicosatetraenoyl (arachidonoyl), n-dodecanoyl (lauroyl), n-tetradecanoyl (myristoyl), n-hexadecanoyl (palmitoyl), n-octadecanoyl

THIS PAGE BLANK (8571)

THIS PAGE BLANK (8571)

THIS PAGE BLANK (8571)



- 13 -

(stearoyl), n-icosanoyl (arachidoyl), n-docosanoyl (behenoyl), n-tetracosanoyl (lignoceroyl).

5 A salt of the phospholipid (I) is preferably pharmaceutically acceptable. Salts are defined by the existence of salt forming groups in substituents  $R_3$  as well as by the free hydroxy group of phosphorous. Likewise the formation of inner salts is also possible. Preferable are alkali metal salts, in particular sodium salts.

10

The component c) is added in a preferred concentration of approx 0.05 to 1.0% by weight, preferably 0.05 to 0.1% by weight with respect to the total weight of the formulation. In a particularly preferred embodiment  
15 form one uses a purified lecithin of soya beans of the quality LIPOID S 100.

Component d): in one of the triglycerides of the formula II used as component d)  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  mean a  
20 straight-chained  $C_{8-24}$ -acyl with an even number of C-atoms, in particular n-octanoyl, n-dodecanoyl, n-tetradecanoyl, n-hexadecanoyl, n-octadecanoyl, 9-cis-dodecenoyl, 9-cis-tetradecenoyl, 9-cis-hexadecenoyl, 9-cis-octadecenoyl or 9-cis-icosenoyl. The meanings of  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  maybe identical  
25 or different, wherein the individual groups  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  themselves are structurally unitarily defined. This is characteristic for synthetic or semi-synthetic triglycerides.  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  may however also consist of vari-

THIS PAGE BLANK (SP1)

- 14 -

ous acyl groups of various structures. This is characteristic for triglycerides of a natural origin.

5 A triglyceride of the formula II is a semi-synthetic or synthetic, essentially pure triglyceride or a pharmaceutically used triglyceride of a natural origin. Preferred is a triglyceride of a natural origin, e.g. peanut oil, sesame oil, sunflower oil, olive oil, maize oil, soya oil, castor oil, cotton seed oil, rape oil, thistle  
10 oil, grape core oil, fish oil or coconut oil. In a particularly preferred embodiment form of the invention one uses a triglyceride with the term neutral oil with various acyl groups of a different structure, e.g. a triglyceride of the fractioned coconut fatty acids C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> of the type  
15 Miglyol®, e.g. MIGLYOL 812.

The triglyceride (II) is, in the composition defined further above, contained in a preferred concentration range of approx. 0.1 to 2.0% by weight, preferably  
20 0.1 to 1.0% by weight with respect to the total weight of the formulation.

The component e) - water as a carrier fluid in the purity required for the dermal application, is according to regulations of the national pharmaceutical list,  
25 free of germs and pyrogens.

THIS PAGE IS BLANK (15/10)

- 15 -

The component f) - aiding agents suitable for dermal application is contained as a facultative component. Such aiding agents are contained in creams, ointments, gels, lotions, pastes, foams, tinctures or lotions.

5

Suitable are in particular ethanol, in particular in low quantity parts of approx 0.1 to 5%, isopropanol, further preservatives, e.g. benzalconium chloride, phenoxyethanol, further benzoe acids or their salts, 4-  
10 hydroxy-benzoe acid esters (PHB-esters), phenols, e.g. tert.-butyl-4-methoxy- or di-tert.-butyl-4-methylphenol, benzylalcohol, 4-chlor- or 2,4-dichlorbenzylalcohol, 2-phenylethanol, chlorhexidindi acetate or digluconate, thiabendazol, cetyltriammonium bromide, cetylpyridinium  
15 bromide, phenododecinium bromide or sorbic acid, antioxidants, e.g. ascorbic acid, cysteine, sulphites, e.g. sodium bisulphite, thioglycol or glutathion, essential oils for improving the smell, i.e. menthol oil, orange oil, bitter orange oil, mandarin oil or lemon oil, or sol-  
20 vents or means for preventing evaporation, e.g. polyalcohols, e.g. propylene glycol, polyethylene glycol or glycerine.

Likewise the subject-matter of the present  
25 invention is the method, known per se, for manufacturing the pharmaceutical composition, which is characterised in that one mixes a lipophile phase consisting of the components a) to d) with the aqueous carrier fluid which where



- 16 -

appropriate contains aiding agents suitable for dermal forms of administration, and where desired subjects the obtainable clear opalescent dispersion based on nanoparticles - nanodispersion - to the following subsequent operations: the addition of a further quantity of water as a carrier fluid as well as where appropriate further water soluble aiding agents, which are suitable for dermal forms of administration, and where appropriate filtration (e.g. sterile filtration) of the nanodispersion; and/or further processing of the nanodispersion to a dermal preparation.

According to this method one manufactures a lipophile phase "oil phase" consisting of the component c) - phospholipid (I) -, ethanol, component b) - partial fatty acid ester of polyoxyethylene sorbitan -, component a) - active ingredient, and of the component d) - triglyceride (II). The mixing of the components is effected at room temperature at low speed with a conventional stirrer with a propeller or winged blade, a magnet stirrer or static mixer.

In a preferred embodiment form of the invention one uses a combination of various partial fatty acid esters of polyoxyethylene sorbitan, in particular the combination consisting of polysorbate 20, 80 and 60. At the same time one respects the sequence, in that one first mixes the phospholipid and the ethanol together and then adds after one another polysorbate 20, 80, 60.

THIS PAGE BLANK (USTC)



- 17 -

Subsequently one adds neutral oil. By mixing the lipophile phase ("oil phase") with the aqueous phase, which may contain water soluble facultative additions, e.g. preservatives, with a low speed mixing machinery (200 to 1,000  
5 r.p.m.) there forms the pharmaceutical composition defined earlier, which may be defined as a dispersion of colloidal nanoparticles of the lipophile active ingredient hydrocortisone or simplified as a nanodispersion. On account of laser light dispersion measurements and recordings in the electron microscope the colloidal particles,  
10 present in the nanodispersion, of other formations such as fluid crystals, micelles, reverse micelles or liposomes may be distinguished. For the statistical majority of more than 95%, preferably more than 98% an average particle  
15 size of less than 50nm is characteristic.

For characterising the obtainable nanodispersion, methods known per se are suitable, e.g. optical judgement: weak to strong opalescence of the preparation  
20 can be easily recognised (indication of an average particle size of smaller than 50 nm), laser light dispersion (determining the particle size and homogeneity), electron microscopy (freezing breakage and negative contrast technology).

25

The nanodispersion is after the addition of the desired quantity of water and where appropriate further aiding agents, applicable for dermal forms of administra-

THIS PAGE BLANK (SP1)

- 18 -

tion, e.g. directly applicable as a dosage spray. A particular advantage with respect to conventional dermal preparations is the possibility of sterile filtration. If desired by way of sterile filtration one may separate all  
5 larger particles with a diameter larger than approx. 200 nm in the dispersion, as well as floating and solid matter, and thus manufacture a nanodispersion with a fraction of particles with a relative uniform size.

10 Measured quantities of nanodispersion are filled, where appropriate as a concentrate, in suitable containers for a dose unit. Suitable vessels are e.g. vessels for pump sprays or dosage sprays or plastic vessels with an outlet device.

15 The pharmaceutical composition described earlier with the anti-inflammatory agent hydrocortisone is suitable as a dermal preparation for treating many diseases of the skin or on the eye. At the same time one  
20 applies the preparation in the prescribed dosage.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 19 -

The following example illustrates the invention:

Recipe for a hydrocortisone 0.1% - nano-

5	colloidal dosage spray formulation.			
	position	dosage %(w/w)	amount g	component
	1	0.063	7.56	Lipoid S100
	2	0.625	75.00	Ethanol abs.
10	3	1.750	210.00	Polysorbate 20
	4	1.000	120.00	Polysorbate 80
	5	0.175	21.00	Polysorbate 60
	6	0.105	12.60	hydrocortisone Base micro BP88
15	7	0.750	90.00	Miglyol 812
	8	94.930	11391.60	Aqua purificata
	9	0.602	72.24	phenoxyethanol
	Total:	100.00	12000.00	

20 By the addition of (9) into (8) at room temperature one manufactures the aqueous phase. One obtains the oil phase by placing (1) into (2) until the solution becomes clear. Subsequently one adds after one another (3), (4), and (5) - polysorbate 20, 80 and 60 and stirs,  
25 until the mixture becomes clear. One adds the active ingredient (6) in three portions, and heats to 60° C until crystals are no longer visible. One adds (7) mixes until the solution becomes clear and cools to room temperature.

END PAGE BLANK (USPTO)

- 20 -

One unifies the aqueous phase with the oil phase, in that one places the aqueous phase at room temperature and stirs at 300 - 400 r.p.m with a magnetic stirring machinery. Subsequently one injects over a period  
5 of time of approx. two minutes slowly under the level the oil phase into the aqueous phase. One stirs for a further 5 - 10 minutes avoiding foam formation and filters the nanodispersion through a germ filter (0.2 $\mu$ m).

---

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Claims

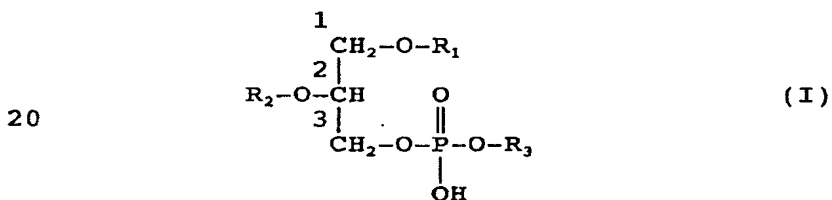
1. A pharmaceutical composition for the dermal  
5 application of a corticoid containing:

a) the active ingredient 11, 17, 21 -trihydroxypregn-4-en-  
3,20-dion (hydrocortisone) or a derivative thereof, where  
appropriate in combination with a wound healing agent;

10

b) at least one partial fatty acid ester of polyoxyethy-  
lene sorbitan or a combination thereof;

c) at least one essentially pure phospholipid of the for-  
15 mula:



25 where R<sub>1</sub> indicates C<sub>10-20</sub>-acyl, R<sub>2</sub> hydrogen or C<sub>10-20</sub>-acyl, R<sub>3</sub>  
hydrogen, 2-trimethylamino-1-ethyl, 2-amino-1-ethyl, C<sub>1-4</sub>-  
alkyl, C<sub>1-5</sub>-alkyl substituted by carboxy, C<sub>2-5</sub>-alkyl substi-  
tuted by hydroxy, C<sub>2-5</sub>-alkyl substituted by carboxy and  
hydroxy or C<sub>2-5</sub>-alkyl substituted by carboxy and amino, the  
30 inositol or glyceryl group, or salts of these compounds;

d) a triglyceride of the formula:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 22 -



where R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> indicates C<sub>8-24</sub>-acyl;

10 e) water as a carrier fluid in the purity required for the transdermal application; and where appropriate

f) aiding agents suitable for dermal forms of administration.

15

2. A pharmaceutical composition according to claim 1, containing as component a) the active ingredient hydrocortisone or the 21-acetate, 21-acetate-17-propionate (aceponate), 21-bendazac, 17 $\alpha$ -butyrate, 17 $\alpha$ -butyrate-21-propionate, 21-cipionate (cyclopentane propionate), 21-disodium phosphate, 21-hydrogen succinate, 21-sodium succinate, 21-tebutate (tert. butyl acetate), 17-valerate or xanthogenate, where appropriate in combination with an epithelisation agent.

25

3. A pharmaceutical composition according to claim 2 containing as a component a) the active ingredient hydrocortisone or the 21-acetate, where appropriate in combination with dexpanthenol.

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. A pharmaceutical composition according to one of claims 1 to 3 containing as component b) a combination of various partial fatty acid esters of polyoxyethylene sorbitan.

5

5. A pharmaceutical composition according to claim 4 containing as component b) the combination consisting of polysorbate 20, 80, 60.

10

6. A pharmaceutical composition according to one of the claims 1-5 containing as component c) purified lecithin of soya beans and as component d) a triglycerid from the group of neutral oils.

15

7. A pharmaceutical composition according to one of the claims 1-6 containing  
a) the active ingredient hydrocortisone as a free base or the 21-acetate, where appropriate in combination with dexpanthenol;

20

b) the composition consisting of polysorbate 20, 80 and 60;

c) purified lecithin from soya beans;

d) a triglyceride from the group of neutral oils; and

e) water as a carrier fluid in the purity required for the dermal application; and where appropriate

25

f) aiding agents suitable for dermal forms of administration.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8. A method for manufacturing the pharmaceutical composition according to claim 1 for the dermal application of a corticoid, characterised in that one mixes a lipophile phase consisting of the components a) to d) with  
5 the aqueous carrier fluid which where appropriate contains aiding agents suitable for dermal forms of administration, and where desired subjects the obtainable clear opalescent dispersion based on nanoparticles - nanodispersion - to the following subsequent operations: the addition of a  
10 further quantity of water as a carrier fluid as well as where appropriate further water soluble aiding agents, which are suitable for dermal forms of administration, and where appropriate filtration of the nanodispersion; and/or further processing of the nanodispersion to a dermal preparation.  
15

9. A method according to claim 8, characterised in that as component b) one uses the combination consisting of polysorbate 20, 80 and 60.  
20

10. A method according to claim 9, characterised in that one adds polysorbate 20, polysorbate 80 and polysorbate 60 after one another.

25 11. The dispersion based on nanoparticles obtainable according to the method according to claim 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)



12. The concentrate, filtrate or dry preparation containing nanoparticles with the active ingredient hydrocortisone, obtainable according to the method according to claim 7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cortisol spray

Abstract

5

The present invention relates to a pharmaceutical composition for the dermal application of hydrocortisone. One disperses this active ingredient with the addition of a partial fatty acid ester of polyoxy-  
10 ethylene sorbitan and of further aiding agents such as lecithin and neutral oil. With this one obtains a suspension of nanoparticles of the lipophile active ingredient hydrocortisone.

15

20

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**